

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 864**

51 Int. Cl.:

C12N 1/12 (2006.01)

C12N 13/00 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

C12P 23/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013 PCT/FR2013/050542**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2013 WO13136025**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013 E 13715325 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2825629**

54 Título: **Producción de ácido docosahexanoico y/o de ácido eicosapentanoico y/o carotenoides en modo mixótrofo por Nitzschia**

30 Prioridad:

16.03.2012 FR 1252378

16.08.2012 FR 1257843

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

12.03.2018

73 Titular/es:

FERMENTALG (100.0%)

4 rue Rivière

33500 Libourne, FR

72 Inventor/es:

ROMARI, KHADIDJA;

GODART, FRANÇOIS y

CALLEJA, PIERRE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 658 864 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

Producción de ácido docosahexanoico y/o de ácido eicosapentanoico y/o carotenoides en modo mixótrofo por *Nitzschia*

5 La invención se refiere a un procedimiento de cultivo en modo mixótrofo, principalmente en presencia de una iluminación descontinua y/o variable de luz, de una microalga del género *Nitzschia*, en concreto de la especie *Nitzschia brevirostris*. El procedimiento permite obtener un alto rendimiento en biomasa y un enriquecimiento de microalgas así cultivadas en lípidos y más especialmente en ácido docosahexanoico (ADH) y/o de ácido eicosapentanoico (AEP). El procedimiento permite asimismo seleccionar cepas de *Nitzschia*, en especial de *Nitzschia brevirostris*, con carácter mixótrofo, y que tiene un alto rendimiento en lípidos y más específicamente en ácidos grasos poliinsaturados, y/o un alto rendimiento en carotenoides, más específicamente, en fucoxantina. La invención se refiere también a una nueva cepa de microalga que pertenece a la especie *Nitzschia brevirostris*, especialmente adaptada a la producción de ácidos grasos y carotenoides. Esta nueva cepa de *Nitzschia brevirostris* es útil para producir ácido docosahexanoico (ADH) y ácido eicosapentanoico (AEP) y/o fucoxantina en modo mixótrofo.

15 **Antecedentes**

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos con carácter autótrofo, es decir que tienen aptitud de crecer de manera autónoma por fotosíntesis.

La microalgas se desarrollan tanto en medios acuáticos marinos como en aguas dulces o someras, así como en diversos hábitats terrestres.

20 La mayor parte de las especies de microalgas encontradas en el agua dulce o los océanos son generalmente autótrofas, es decir que no pueden crecer más que por fotosíntesis. Para éstas, la presencia en su medio de sustratos carbónicos orgánicos o de materia orgánica no les es favorable y no mejora su crecimiento. Sin embargo, un determinado número de especies de microalgas, de familias y de orígenes muy diversos, se comprueba que no son estrictamente autótrofas. Es así que determinadas entre ellas, denominadas heterótrofas, son capaces de desarrollar en ausencia total de luz, por fermentación, es decir aprovechando la materia orgánica.

Otras especies de microalgas, para las que la fotosíntesis resulta indispensable en su desarrollo, son capaces a la vez de aprovechar la fotosíntesis y la materia orgánica presente en su medio. Estas especies intermedias, llamadas mixótrofas, pueden cultivarse a la vez en presencia de luz y de materia orgánica.

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

Las microalgas constituyen actualmente el objeto de numerosos proyectos industriales porque determinadas especies son capaces de acumular o de segregar cantidades importantes de lípidos, principalmente de ácidos grasos poliinsaturados.

35 Entre estos ácidos grasos poliinsaturados, algunos muy insaturados (AGHI) de la serie de los omega-3 (PUFA- ω 3), en especial el ácido eicosapentanoico (AEP o C20:5 ω 3) y el ácido docosahexanoico (ADH o C22:6 ω 3), y de la serie de los omega-6 (PUFA- ω 6), en especial el ácido araquidónico (ARA o AA o aún el ácido eicosatetranoico C20:4 ω 6) tienen una importancia nutritiva reconocida y presentan fuertes potencialidades desde el punto de vista de las aplicaciones terapéuticas.

40 Considerado como alimento especial, el ADH es necesario para el desarrollo normal y funcional de las células, y desempeña una función crucial en los diversos procesos y funciones bioquímicos. Su naturaleza poliinsaturada le confiere una importancia crucial frente a las propiedades de la membrana celular, en los vegetales como en los animales: fluidez, flexibilidad y permeabilidad selectiva que permite por ejemplo una adaptación eficaz, e incluso la supervivencia, a bajas temperaturas, en especial en los peces.

45 El ADH es un constituyente estructural principal del cerebro humano. El ADH representa el 15-20% de la corteza cerebral (el cerebro de un adulto contiene al menos 20 g de ADH) y el 30-60% de la retina. Es indispensable para el desarrollo del sistema nervioso central y para la función retiniana, por incorporación en las membranas celulares, y desempeña una función capital en la adquisición y el mantenimiento satisfactorio de los mecanismos de la visión y de la memoria.

50 Los aceites de pescados, provenientes de la industria de la pesca, son actualmente la principal fuente comercial de este tipo de ácidos grasos. Sin embargo, mientras que estos aceites encuentran nuevas aplicaciones (complemento alimentario en acuicultura, incorporación en las margarinas), los recursos pesqueros marinos se rarifican por el hecho de la actividad de pesca intensiva.

Deben buscarse nuevas fuentes de ácidos grasos tales como el AEP, el ADH y el ARA a fin de responder, en el futuro, a la demanda creciente en el mercado de este tipo de ácidos grasos poliinsaturados.

Además de su capacidad de sintetizar los ácidos grasos *de novo*, las microalgas ofrecen varias ventajas con relación a los aceites de pescado: son cultivables *in vitro* en condiciones controladas, lo que permite la producción de una biomasa de composición bioquímica relativamente constante y, por otra parte, contrariamente a los aceites de pescados, no presentan olor desagradable y sus lípidos no contienen o poco colesterol.

En fin, los lípidos producidos por las microalgas tienen unas características de ácidos grasos más simples que las de los aceites de pescados, lo que limita las etapas de separación de los ácidos grasos de interés.

Actualmente, la clasificación de las algas se basa todavía en gran medida en criterios morfológicos y en la naturaleza de pigmentos fotosintéticos que contienen sus células. De este hecho es poco indicativo el carácter autótrofo, heterótrofo o mixótrofo de las especies de algas, mientras que estas últimas recubren una diversidad muy grande de especies y de formas [Dubinsky *et al.* (2010); *Hydrobiologia*, 639:153-171].

La clasificación taxonómica de las algas eucariotas contiene 14 tipos. Entre las especies de diferentes clases que componen estos tipos, que producen ácidos grasos, existen variaciones importantes en lo que concierne al contenido de microalgas en ácidos grasos poliinsaturados. Además, las proporciones relativas de lípidos, principalmente de AEP, de ADH y de AAR en los perfiles lipídicos, varían según la especie y las condiciones de cultivo.

Por otra parte, los carotenoides son asimismo moléculas de interés. Se utilizan generalmente como pigmentos, pero desempeñan también una función importante en la salud del hombre como agentes antioxidantes. En fin, presentan capacidad de estimular el sistema inmunitario. La fucoxantina es un ejemplo de un carotenoide, y está contenida principalmente en el wakame, alga utilizada en la cocina japonesa.

Para aplicar la producción de ácidos grasos y/o carotenoides por microalgas a escala industrial, deben tenerse en cuenta varios factores. Por ejemplo, los cultivos pueden realizarse en condiciones autótrofas, mixótrofas o heterótrofas según la cepa, la temperatura, las condiciones de luz y el tamaño de los fermentadores. Por ejemplo, los cultivos pueden realizarse igualmente en recipientes de un litro, en un laboratorio, en fotobiorreactores y en contenedores de 100.000 litros o bien en estanques abiertos (varias hectáreas). No obstante, los gastos energéticos y de otros recursos tales como la mano de obra y la facilidad de seguir el cultivo deben tenerse en cuenta desarrollando condiciones de cultivo ideales.

En todo caso, es deseable que las microalgas se cultiven en condiciones óptimas para aumentar el rendimiento del ácido o ácidos grasos y de los carotenoides a producir. Así, es preferible tener el rendimiento más elevado posible (por ejemplo, una biomasa mayor de 30 g/l de materia seca, y más del 20% de ácidos grasos en peso con relación a los lípidos totales). Para los carotenoides, es deseable un rendimiento superior al 0,2% en materia seca de microalgas.

Las microalgas del género *Nitzschia* son diatomeas marinas que se encuentran generalmente en las aguas frías tales como las del Ártico o del Antártico. Estas microalgas son conocidas principalmente por la producción de ácido eicosapentanoico (AEP) en modo heterótrofo.

Se nota sin embargo que el modo mixótrofo se ha estudiado en la especie *Nitzschia laevis* a fin de evaluar su impacto en la síntesis de AEP (*Biotechnology Letters*, 2000, 22(9):727-733).

Así, es al término de numerosos experimentos en condiciones de luz habituales y por agregación de diferentes sustratos que el solicitante ha llegado a aislar cepas de microalgas de la especie *Nitzschia brevis*, cultivables en modo mixótrofo permitiendo, en las condiciones de la presente invención, una producción con alto rendimiento de ácidos grasos poliinsaturados, en especial ADH, y/o AEP y/o fucoxantina.

Una cepa (FCC 810) representativa de nuevas cepas de *Nitzschia brevis* así aisladas y seleccionadas, se ha depositado ante la CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa, Scottish Association for Marine Science, Dunstaffnage Marine Laboratory, Oban, Argyll PA371QA, Escocia, Reino Unido) según las disposiciones del Tratado de Budapest, con el número de ingreso CCAP 1052/21.

El procedimiento de cultivo y de selección ha consistido más especialmente en cultivar las microalgas en condiciones de mixotrofia, en presencia de una iluminación variable y/o discontinua, principalmente en forma de destellos, con una gama de variaciones de intensidad luminosa y una frecuencia específicas.

La alternancia aproximada de las fases iluminadas y de las fases oscuras o de menor intensidad luminosa, percibida generalmente como estresante por las microalgas, ha permitido, de manera sorprendente, obtener cepas de *Nitzschia brevis* que tienen una producción elevada de biomasa, de lípidos y más especialmente de ácidos grasos poliinsaturados y/o de carotenoides, en especial de la fucoxantina. Esta aplicación de cepas según la invención abre la perspectiva de una producción industrial de ácidos grasos poliinsaturados, en especial de ADH y/o

de AEP, y/o de la fucoxantina, en fermentadores que se benefician de un aporte luminoso reducido, y debería pues permitir realizar ahorros de energía con relación a los modos de cultivo autótrofos.

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

Descripción detallada

5 La presente invención tiene pues por objeto un procedimiento de cultivo de microalgas del género *Nitzschia*, principalmente de la especie *Nitzschia brevisrostris*, en modo mixótrofo en condiciones de iluminación discontinua y/o variable a lo largo del tiempo, presentando la iluminación variaciones de intensidad entre las fases iluminadas y las fases oscuras cuya amplitud está comprendida entre 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, preferentemente entre 30 y 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Estas variaciones que tienen lugar entre 2 y 3.600 veces por hora, preferentemente, entre 2 y 200 veces por hora. El procedimiento según la invención permite un enriquecimiento de microalgas del género *Nitzschia* en ácidos grasos poliinsaturados, más específicamente en ADH y/o en AEP, y/o en carotenoide(s), más específicamente en fucoxantina.

10 Estas condiciones de cultivo permiten aportar una cantidad definida de luz. Este aporte luminoso puede comportar fases de iluminación discontinua y/o variable, con variaciones de intensidad que pueden tener amplitudes idénticas o diferentes. La iluminación puede ser especialmente en forma de destellos.

15 Este procedimiento tiene la ventaja de aumentar el rendimiento en biomasa obtenida del cultivo. Tiene también la ventaja de enriquecer las microalgas así cultivadas en ácidos grasos poliinsaturados, más especialmente en ácido docosahexanoico (ADH) y/o en ácido eicosapentanoico (AEP), y/o en carotenoide(s), más especialmente en fucoxantina. Este procedimiento también puede ser utilizado para seleccionar cepas del género *Nitzschia*, en particular, de la especie *Nitzschia brevisrostris*, de carácter mixótrofo, y que tienen un alto rendimiento de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente en ADH y/o AEP, y o en carotenoide(s), más particularmente en fucoxantina.

20 El cultivo en modo mixótrofo de esta microalga se lleva a cabo preferentemente en presencia de 5 mM a 1 M, preferentemente de 50 mM a 800 mM, más preferentemente de 70 mM a 600 mM, y aún más preferentemente de 100 mM a 500 mM un sustrato de carbono orgánico. El aporte del sustrato se asegura de forma continua durante el cultivo a fin de permitir a las células acumular una concentración importante de lípidos. Se agrega sustrato adicional al medio de cultivo durante el proceso de cultivo para mantener una concentración constante. Este sustrato carbonoso orgánico comprende preferentemente, en forma pura o en mezcla: glucosa, derivados de celulosa, lactato, lactosa, sacarosa, acetato y/o glicerol.

25 El sustrato de carbono orgánico contenido en el medio de cultivo puede consistir en moléculas complejas o una mezcla de sustratos. Los productos resultantes del metabolismo del almidón, por ejemplo a partir de maíz, trigo o patata, especialmente los hidrolizados de almidón, que están constituidos por moléculas pequeñas, son, por ejemplo, sustratos de carbono orgánico adaptados al cultivo en mixotrofia de microalgas según la invención.

30 Este procedimiento está más especialmente destinado a la aplicación de nuevas cepas de microalgas del género *Nitzschia* (Tipo: Bacillariophyta, Orden: Bacillariales, Familia: Bacillariaceae) [ITIS Catalogue of Life, 2010] seleccionadas por su carácter mixótrofo, especialmente por su capacidad para ser cultivadas con un aporte luminoso superior a 10 μE , en un medio mineral, por ejemplo, medio f plus sílice enriquecido en nitrógeno [Guillard, R.R.L. (1975). *Culture of Marine Invertebrate Animals*, págs. 26-60. Smith W.L. y Chanley M.H. (Eds.) Plenum Press, Nueva York], en el que se agrega un sustrato de carbono orgánico. Preferentemente, el sustrato de carbono orgánico comprende glucosa, o lactato, en una concentración equivalente o superior a 5 mM.

35 Estas nuevas cepas de *Nitzschia*, más especialmente *Nitzschia brevisrostris* pueden aislarse y seleccionarse según el procedimiento de selección y cultivo según la invención descrito más adelante.

40 Una cepa representativa de las cepas de *Nitzschia* según la invención es la cepa FCC 810 aislada por el solicitante y depositada en la CCAP, con el número CCAP 1052/21. Dichas cepas son capaces de producir cantidades significativas de biomasa así como de lípidos y más especialmente ADH y/o AEP cuando se cultivan en modo mixótrofo con un aporte de luz variable o discontinuo, según la invención. También son capaces de producir cantidades significativas de carotenoide(s), más especialmente fucoxantina.

Según los análisis taxonómicos realizados, la cepa CCAP 1052/21 pertenece a la especie *Nitzschia brevisrostris*.

45 Las cepas de *Nitzschia brevisrostris* aisladas permiten producir, en condiciones de mixotrofia, cantidades significativas de la biomasa, así como lípidos ricos en ADH y/o AEP, dichos ADH o AEP puede representar más de 20%, más del 25% o más 30% de los lípidos totales contenidos en microalgas. Asimismo las cepas de *Nitzschia brevisrostris* aisladas permiten producir, en condiciones mixotrofia, cantidades significativas de carotenoide(s), más especialmente fucoxantina, que puede representar más de 0,2% en materia seca, más preferentemente más de 0,25 % en materia seca de la materia seca total de microalgas (lo que incluye la cantidad de carotenoides contenidos en dichas microalgas).

En la presente invención, la biomasa obtenida con la cepa FCC 810, aislada por el solicitante, de un cultivo en condiciones mixotróficas en presencia de una iluminación variable y/o discontinua, especialmente en forma de destellos, es de 10 a 60%, más generalmente de 20 a 50%, mayor que la de un cultivo con la misma cepa llevado a cabo en modo heterótrofo. Por modo heterótrofo se entiende las condiciones de cultivo con un medio de cultivo idéntico, pero sin aporte de luz.

La invención tiene así por objeto un método de cultivo de microalgas del género *Nitzschia*, especialmente de la especie *Nitzschia brevirostris* en modo mixótrofo, en presencia de una iluminación variable o discontinua a lo largo del tiempo, por ejemplo en forma de destellos, especialmente para producir ácidos grasos poliinsaturados, tales como ADH y/o AEP, y/o un o carotenoide(s), tal como la fucoxantina.

Ha parecido que una iluminación variable y/o discontinua de los cultivos, en particular en la aplicación de un cultivo en modo mixótrofo, tenía un impacto favorable sobre el desarrollo de las algas y permitía aumentar la productividad de las mismas, especialmente en lo que respecta a su producción de lípidos y/o carotenoides. Sin estar limitado por la teoría, el inventor cree que un aporte discontinuo y/o variable de luz a las microalgas tiene el efecto de provocar un "estrés" favorable al crecimiento y a la síntesis de lípidos y/o carotenoides. Este fenómeno podría explicarse, en parte, por el hecho de que en la naturaleza, las microalgas tienden a acumular reservas lipídicas y/o en carotenoides para resistir las tensiones de su medio.

Por iluminación discontinua, es necesario entender una iluminación acentuada por períodos de oscuridad. Los períodos de oscuridad pueden ocupar más de una cuarta parte del tiempo, preferentemente la mitad del tiempo o más, durante el cual se cultivan las algas.

Según un aspecto preferido de la invención, la iluminación es discontinua y más preferentemente en forma de destellos. Un destello, en el sentido de la invención, es un corto período de iluminación, es decir, de menos de 30 minutos. La duración del destello puede ser inferior a 15 minutos, preferentemente inferior a 5 minutos o incluso más preferentemente inferior a 1 minuto. Según algunas realizaciones de la invención, la duración del destello puede ser menor de un segundo. Por ejemplo, la duración del destello puede ser 1/10 de segundo, 2/10 de segundo, 3/10 de segundo, 4/10 de segundo, 5/10 de segundo, 6/10 de segundo, 7/10 de segundo, 8/10 de segundo o 9/10 de segundo. La iluminación, o el destello, generalmente es de una duración superior a 15 segundos. La duración del destello generalmente está comprendida entre 5 segundos y 10 minutos, preferentemente entre 10 segundos y 2 minutos, más preferentemente entre 20 segundos y 1 minuto.

Según la invención, el número de destellos está comprendido entre aproximadamente 2 y 3.600 por hora. Puede estar comprendido, por ejemplo, entre 100 y 3.600 destellos por hora. También puede estar comprendido igualmente entre 120 y 3.000, o entre 400 y 2.500, o entre 600 y 2.000, o entre 800 y 1.500 destellos por hora. También puede estar entre 2 y 200, preferentemente entre 10 y 150, más preferentemente entre 15 y 100, e incluso más preferentemente entre 20 y 50 por hora. Los destellos pueden emitirse a intervalos regulares o no en el tiempo. Si se emite a intervalos regulares, el número de destellos por hora corresponde a una frecuencia (F) que tiene un período de tiempo (T), considerándose que $F = 1/T$. Este período de tiempo puede estar comprendido entre 1 segundo y 30 minutos, o entre 1 segundo y 36 segundos, o incluso entre 1,2 segundos y 30 segundos, o entre 1,44 segundos y 9 segundos, o entre 1,8 segundos y 6 segundos, o entre 2,4 segundos y 4,5 segundos. Esta frecuencia también puede estar entre 18 segundos y 30 minutos, preferentemente entre 24 segundos y 6 minutos, más preferentemente entre 36 segundos y 4 minutos, e incluso más preferentemente entre 72 segundos y 3 minutos. El número de destellos por hora se elige según la intensidad y la duración de los destellos (véase a continuación). Según la invención, la intensidad de la luz suministrada en forma de destellos está entre 30 y 1.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, preferentemente entre 30 y 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, o 50 y 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, y más preferentemente entre 150 y 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Por definición, 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ corresponde a 1 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Einstein), unidad utilizada a menudo en la bibliografía.

Según una realización concreta de la invención, la intensidad de la luz está comprendida entre 50 y 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, el período de tiempo de la frecuencia de los destellos está comprendido entre 10 segundos y 60 minutos para una duración del destello entre 1 segundo y 1 minuto.

Según la invención, cualesquiera que sean las condiciones de iluminación, la intensidad luminosa proporcionada a las algas en cultivo, expresada en micromoles de fotones por segundo por metro cuadrado ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), varía al menos una vez en la misma hora. La amplitud de esta variación de intensidad de luz generalmente está comprendida entre 30 y 1.000, o entre 50 y 800, o entre 100 y 600 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. La intensidad de la luz también puede variar, entre 30 y 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Preferentemente, la amplitud de la variación de la intensidad de la luz está comprendida entre 70 y 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y más preferentemente entre 100 y 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Alternativamente, en condiciones de iluminación discontinua, dicha intensidad luminosa puede alcanzar sucesivamente, varias veces en la hora, por ejemplo, los valores 0 y 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, los valores 0 y 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ o preferentemente aún los valores 0 y 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. También puede alcanzar sucesivamente, varias veces en la hora, por ejemplo, los valores 0 y 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, los valores 0 y 600 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, los valores 0 y 800 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ o incluso los valores 0 y 1000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Según un modo de la invención y cualesquiera que sean las condiciones de iluminación, la intensidad de la luz proporcionada al cultivo varía según la densidad celular. Cuanto más densa es el cultivo, más intensa es la luz. La densidad celular es el número de células por ml y se mide según las técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

- 5 Cuando el cultivo alcanza una densidad entre 10^6 y 10^7 células por ml, la intensidad de la luz puede aumentarse hasta entre 30 y 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, por ejemplo, preferentemente entre 50 y 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Cuando el cultivo, en la etapa final, alcanza una densidad entre 10^7 y 10^8 células por ml, la intensidad luminosa se puede aumentar hasta entre 100 y 1.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ por ejemplo, preferentemente entre 200 y 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

- 10 Según un modo de la invención, la cantidad de luz aportada al cultivo en la hora permanece entre ciertos valores. Está comprendida entre aproximadamente 2.000 y 600.000, preferentemente entre 2.000 y 300.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$. Puede estar comprendida entre aproximadamente 4.000 y 200.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$, por hora.

Según otro modo de la invención, el cultivo se ilumina con 120 destellos por hora, teniendo cada destello una duración de 10 segundos y una intensidad de 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, lo que proporciona un aporte total de luz por hora de 240.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$.

- 15 Como se describe para la intensidad de luz anteriormente, y según un modo de la invención, la cantidad de luz proporcionada al cultivo por hora puede variar dependiendo de la densidad celular. En la etapa inicial del cultivo, cuando la densidad celular es 10^5 y 5×10^5 células por ml, el aporte total de luz en una hora generalmente está comprendido entre aproximadamente 1.500 y 8.000, preferentemente entre 1.500 y 6.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$, más preferentemente entre 2.000 y 5.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$. Cuando el cultivo alcanza una densidad entre 10^6 y 10^7 células por ml, el aporte total de luz en una hora puede aumentarse hasta entre 6.000 y 67.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$, preferentemente entre 6.000 y 50.000 y más preferentemente entre 12.000 y 45.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$, por ejemplo. En la etapa final del cultivo, a una densidad celular de entre 10^7 y 10^8 células por ml, el aporte total de la luz por hora puede aumentarse hasta entre 45.000 y 300.000, por ejemplo, preferentemente entre 45.000 y 200.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$, y por ejemplo, más preferentemente, entre 50.000 y 150.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$.

- 25 En la etapa inicial del cultivo (a una densidad celular entre 10^5 y 5×10^5 células por ml), el cultivo se ilumina con 30 destellos por hora, teniendo cada destello una duración de 30 segundos y una intensidad entre 5 y 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, lo que proporciona un aporte total de luz por hora de 2.250 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$ a 4.500 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$. Luego, en la etapa intermedia (a una densidad celular entre 10^6 y 10^7 células por ml), el cultivo se ilumina con 30 destellos por hora, teniendo cada destello una duración de 30 segundos y una intensidad entre 15 y 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, que da un aporte total de luz por hora de 13.500 a 45.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$. Luego, en la etapa final de cultivo (a una densidad celular entre 10^7 y 10^8 células por ml), el cultivo se ilumina con 30 destellos por hora, teniendo cada destello una duración de 30 segundos y una intensidad entre 50 y 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, que proporciona un aporte de luz total por hora de 45.000 a 135.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$.

- 35 Según un modo de la invención, por ejemplo, cuando la duración de los destellos es, por ejemplo, de menos de un minuto, o menos de un segundo, en la etapa inicial del cultivo (a una densidad celular entre 10^5 y 5×10^5 células por ml), el cultivo se ilumina con 30 destellos por hora, teniendo cada destello una duración de 10 segundos y una intensidad entre 50 y 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, lo que proporciona un aporte total de luz por hora de 15.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$ a 30.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$. Luego, en la etapa intermedia (a una densidad celular entre 10^6 y 10^7 células por ml), el cultivo se ilumina con 50 destellos por hora, teniendo cada destello una duración de 10 segundos y una intensidad entre 200 y 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, lo que da un aporte total de luz por hora de 100.000 a 150.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$. Luego, en la etapa final del cultivo (a una densidad celular entre 10^7 y 10^8 células por ml), el cultivo se ilumina con 120 destellos por hora, teniendo cada destello una duración de 10 segundos y una intensidad entre 350 y 450 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, lo que da un aporte total de luz por hora de 420.000 a 540.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$.

- 45 El aporte de luz en los cultivos se puede obtener mediante lámparas distribuidas alrededor de la pared externa de los fermentadores. Un reloj dispara estas lámparas para tiempos de iluminación definidos. Los fermentadores se sitúan preferentemente en un recinto resguardado de la luz del día, que puede controlar la temperatura ambiente.

- 50 Como ha podido constatar el solicitante, el hecho de que las cepas así seleccionadas presenten buenas aptitudes para crecer en modo mixótrofo, en presencia de una luz discontinua, predispone a dichas cepas a una mayor producción de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente de ADH y/o AEP, y/o mayor producción de carotenoide(s), más especialmente de fucoxantina.

El procedimiento de cultivo permite así seleccionar cepas del género *Nitzschia*, en especial de la especie *Nitzschia brevirostris* de carácter mixótrofo, similar a la aislada por el solicitante y depositada en la CCAP con el número CCAP 1052/21, y que tiene un alto rendimiento de ácidos grasos poliinsaturados y/o carotenoide(s). Este procedimiento de cultivo se caracteriza por que comprende las etapas siguientes:

- 55 a) el cultivo mixótrofo de una o más varias cepas del género *Nitzschia* en condiciones de iluminación discontinua, presentando la iluminación variaciones de intensidad cuya amplitud está comprendida entre 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y 1000, preferentemente entre 30 y 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, estas variaciones tienen lugar entre 2 y 3.600, preferentemente 5-400 veces por hora,

b) una etapa de mantenimiento de dicho cultivo durante varias generaciones, en presencia de un sustrato de carbono orgánico en el medio de cultivo, y opcionalmente

c) una etapa de recuperación de las microalgas así cultivadas.

5 Por etapa de recuperación se entiende más particularmente el aislamiento de la cepa o cepas cuyo número de células ha aumentado más durante dichas generaciones.

Convenientemente, el cultivo mixótrofo se lleva a cabo en condiciones de iluminación discontinua, presentando la iluminación variaciones de intensidad cuya amplitud está comprendida entre $30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y $400 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, teniendo lugar estas variaciones entre 2 y 200 veces por hora.

10 Para llevar a cabo la selección de las cepas, diferentes cepas del género *Nitzschia*, en especial de la especie *Nitzschia brevirostris*, se puede cultivar, en paralelo, en microplacas en el mismo recinto, con un control preciso de las condiciones y la evolución de los diferentes cultivos. Esto hace que sea fácil conocer la respuesta de las diferentes cepas a la iluminación discontinua y/o variable y, en su caso, a la adición de uno o varios sustratos de carbono orgánicos en el medio de cultivo. Las cepas que responden favorablemente a la iluminación discontinua y/o variable y a los sustratos de carbono orgánicos en general ofrecen un mejor rendimiento para la producción de carotenoides y de lípidos en el plano cualitativo (ácidos grasos poliinsaturados más abundantes en el perfil lipídico y fucoxantina más abundante entre los carotenoides) y cuantitativo (los lípidos contienen una mayor proporción de ADH y/o AEP).

20 Las microalgas pueden seleccionarse en un fermentador a partir de una población heterogénea y de la cual se busca seleccionar las variantes preferidas para ser por el modo de selección que combina luz discontinua y/o variable que presenta una gama de intensidad luminosa y una frecuencia específicas, con condiciones de cultivo mixótrofas. En este caso, el cultivo se practica manteniendo las microalgas en cultivos durante numerosas generaciones, luego al final del cultivo se lleva a cabo un aislamiento de los componentes que han llegado a ser mayoritarios en el medio de cultivo.

El procedimiento de cultivo según la invención también permite producir lípidos.

25 En este caso, el método según la invención comprende además las etapas siguientes:

d) una etapa de recuperación de lípidos de las microalgas y posiblemente

e) la extracción del ADH y/o del AEP de los lípidos recuperados.

El procedimiento de cultivo según la invención también permite producir carotenoides.

En este caso, el procedimiento según la invención también comprende las etapas siguientes:

30 d) una etapa de recuperación de la materia hidrófoba de microalgas y posiblemente

e) la extracción del ADH y/o AEP y/o de la fucoxantina del material hidrófobo recuperado.

El procedimiento de cultivo según la invención también se puede aplicar a cualquier especie del género *Nitzschia*, capaz de crecer en las condiciones mixotróficas según la invención, y capaz de producir ADH y/o AEP y/o fucoxantina.

35 El procedimiento de cultivo según la invención permite optimizar la producción de la biomasa obtenida del cultivo. También permite enriquecer las microalgas así cultivadas en ácidos grasos poliinsaturados, más especialmente en ADH y/o AEP, y/o enriquecer las microalgas así cultivadas con carotenoide(s), más especialmente en fucoxantina.

40 La invención también tiene como objetivo optimizar la producción de biomasa, así como la producción de lípidos, especialmente de ácidos grasos, mediante el cultivo de microalgas del género *Nitzschia* de carácter mixótrofo, preferentemente cultivadas o seleccionadas según los métodos anteriormente mencionados, luego la recuperación de microalgas así cultivadas para extraer el contenido de lípidos, especialmente el ADH y/o el AEP. La invención también pretende optimizar la producción de carotenoide(s), más particularmente fucoxantina. Se refiere especialmente a las cepas de la especie *Nitzschia brevirostris*.

45 Los métodos de extracción selectiva de lípidos cuyo ADH son conocidos por los expertos en la técnica y están, por ejemplo, descritos por [Bligh, E.G. y Dyer, W.J. (1959); A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37:911-917] y por [McCreary D.K., Kossa W.C., Ramachandran S, Kurtz R.R. (1978), "A novel and rapid method for the preparation of methyl esters for gas chromatography: application to the determination of the fatty acids of edible fats and oils.", *J. Chromatogr. Sci.* 16(8):329-31].

50 Los métodos de extracción y de análisis de los fucoxantina carotenoides, de los cuales la fucoxantina, son conocidos por el experto en la técnica y están, por ejemplo, descritos por Wright *et al.* (1991) (S.W. Wright, S.W. Jeffrey, R.F.C.

Mantoura, C.A. Llewellyn T. Bjornland, D. Repeta, N. Welschmeyer. Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Marine ecology progress series*: Vol. 77: 183-196, 1991).

5 La invención también se refiere a la biomasa de microalgas del género *Nitzschia*, que se pueden obtener según el método de la invención tal como se describió anteriormente. Estas microalgas están enriquecidas en ácidos grasos poliinsaturados. Los lípidos totales de dichas microalgas comprenden más de 20%, a menudo más del 25% e incluso a veces más de 30% de ADH y/o AEP en relación al porcentaje total de lípidos. Las microalgas comprenden un contenido de fucoxantina de más del 0,2% en materia seca, preferentemente más del 0,25% en materia seca con relación a la materia seca de microalgas.

Ejemplo 1

10 Los cultivos de *Nitzschia brevirostris* FCC 810 se hicieron en fermentadores (biorreactores) de 2 l útiles con autómatas especializados y supervisión por estación informática. El sistema está regulado en pH por adición de una base (solución de hidróxido de sodio 1 N) y/o ácido (solución de ácido sulfúrico 1 N). La temperatura de cultivo se fija en 25°C. La agitación se lleva a cabo por medio de dos agitadores colocados en el eje según la siguiente configuración: hélice de Rushton y hélices de tres palas de bombeo descendente. La velocidad de agitación y el caudal de aireación se regulan al mín. = 100 rpm y al máx. = 250 rpm y $Q_{\text{mín}} = 0,5 \text{ vvm}$ / $Q_{\text{máx}} = 2 \text{ vvm}$ respectivamente. El biorreactor está equipado con un sistema de iluminación externo que rodea el depósito transparente.

20 Los reactores se inoculan con un precultivo realizado en una mesa de agitación (140 rpm) en un recinto termoestable (25°C) e iluminado entre 80 y 100 μE . Los precultivos y cultivos en biorreactores se llevan a cabo en el medio F más sílice enriquecido en nitrógeno. El sustrato de carbono orgánico utilizado para el cultivo en mixotrofia en biorreactor es glucosa a concentraciones entre 100 mM y 150 mM.

Seguimiento de cultivos:

La concentración en biomasa total se controla midiendo la masa seca (filtración en filtro GFB, Whatman, después secado a la estufa a 100°C durante un mínimo de 24 h antes de la pesada).

25 En cuanto a la cuantificación de los lípidos totales, se han extraído 7.10^8 células/ml. Los métodos de extracción de lípidos son conocidos por los expertos en la técnica.

Iluminación:

El cultivo se ilumina con 180 destellos por hora, teniendo cada destello una duración de 5 segundos y una intensidad de $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

30 El aporte de luz en los cultivos en biorreactor se ha obtenido mediante LED (diodos electroluminiscentes) distribuidos alrededor de la pared externa del fermentador. El control informático activa la alimentación de los LED para tiempos de iluminación o destellos.

Resultados:

	Masa seca (g/l)	Lípidos totales (% de MS)	% ADH	% AEP	Fucoxantina (mg/g)
Destello en mixotrofia	$35,1 \pm 0,7$	$23,6 \pm 0,4$	$0,6 \pm 0,5$	26 ± 1	$2,2 \pm 0,1$
Heterotrofia	$25,4 \pm 0,2$	$24 \pm 0,3$	$0,8 \pm 0,4$	22 ± 1	$0,8 \pm 0,1$

35

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento que comprende las etapas siguientes:
 - a) el cultivo en modo mixótrofo de una o más cepas del género *Nitzschia* en condiciones de iluminación discontinuos y/o variable a lo largo del tiempo, presentando la iluminación variaciones de intensidad entre las fases iluminadas y las fases oscuras, cuya amplitud está comprendida entre 30 y 1.000 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, teniendo lugar estas variaciones entre 2 y 3.600 veces por hora,
 - b) una etapa de mantenimiento de dicho cultivo durante varias generaciones en presencia de un sustrato de carbono orgánico en el medio de cultivo, y
 - c) una etapa de recuperación de las microalgas así cultivadas.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la iluminación presenta variaciones de intensidad cuya amplitud está comprendida entre 30 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y 400 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, teniendo lugar estas variaciones entre 2 y 200 veces por hora.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que la microalga es de la especie *Nitzschia breviostris*.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, 2 o 3, caracterizado por que el cultivo se lleva a cabo en presencia de un sustrato de carbono orgánico a una concentración de 5 mM a 1 M, preferentemente de 50 mM a 800 mM, más preferentemente de 70 mM a 600 mM, e incluso más preferentemente de 100 mM a 500 mM, seleccionándose el sustrato de carbono orgánico entre el lactato, la lactosa, la sacarosa, el acetato, el glicerol, la glucosa y derivados de celulosa y una mezcla de estas moléculas.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado por que dicho sustrato de carbono orgánico presente en el medio de cultivo comprende al menos glucosa 5 mM.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por que la amplitud de las variaciones de intensidad está comprendida entre 70 y 300 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, y más preferentemente entre 100 y 200 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que el aporte de luz se aplica en forma de destellos.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por que un destello tiene una duración comprendida entre 1/10 de segundo y 10 minutos, preferentemente entre 5 segundos y 10 minutos, más preferiblemente entre 10 segundos y 2 minutos, más preferiblemente aún entre 20 segundos y 1 minuto.
9. Procedimiento según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, caracterizado por que el número de destellos está comprendido entre 5 y 3.600, preferentemente entre 10 y 150, más preferentemente entre 15 y 100, más preferentemente entre 20 y 50 veces por hora.
10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que el aporte total de luz por hora en micromoles de fotones está comprendido entre 2.000 y 600.000, preferentemente entre 2.000 y 200.000 $\mu\text{mol. m}^{-2}$.
11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado por que comprende además las etapas siguientes:
 - d) una etapa de recuperación de la materia hidrófoba de la microalga, seguido, si es necesario,
 - e) de la extracción del ADH y/o AEP y/o fucoxantina de la materia hidrófoba recuperada.
12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 11, caracterizado por que dicha microalga de la especie *Nitzschia breviostris* corresponde a la cepa FCC 810, depositada en la CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) con el número CCAP 1052/21.
13. Biomasa de microalgas del género *Nitzschia*, que puede obtenerse por el procedimiento de una de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizada por que comprende más de 30 g/l de materia seca y que sus lípidos totales que comprenden más de 20 %, más del 25% o más del 30% de AEP y/o ADH y por que comprenden más del 0,2% en peso de fucoxantina con relación al peso total de materia seca.
14. Biomasa según la reivindicación 13, caracterizada por que las microalgas pertenecen a la especie *Nitzschia breviostris*.