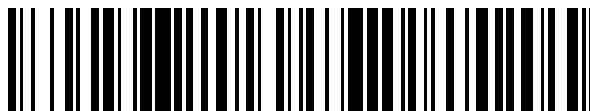


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 369**

21 Número de solicitud: 201731448

51 Int. Cl.:

C12N 11/02 (2006.01)

C12N 1/12 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

C12M 3/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

21.12.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

21.06.2018

71 Solicitantes:

MICROALGAE SOLUTIONS S.L. (100.0%)
Calle Galicia, 10. 2ºB
28320 Pinto (Madrid) ES

72 Inventor/es:

DE LA ROCHE CADAVID, Juan Pablo y
GALÁN GÓMEZ, Pedro Luis

54 Título: **Método de cultivo, sistema de cultivo y biomasa de consorcios ad-hoc de microalgas y cianobacterias en biofilm con fines industriales.**

57 Resumen:

Un método y un sistema, para el cultivo de consorcios ad-hoc de especies de microalgas y cianobacterias en biofilm, y una biomasa de consorcio para fines industriales.

El método comprende las etapas de elaboración del medio de cultivo, cultivo de cepas puras y cultivos axénicos y finalmente la siembra de las especies en el sistema de cultivo. En cada etapa se establecen el tipo de medio de cultivo, la iluminación, la temperatura y la conductividad.

El sistema comprende un Foto-fermentador Abierto de Células Inmovilizadas (FACI) y un mecanismo de bombeo del medio de cultivo. Este FACI opera al menos de dos maneras: controlando el medio de cultivo, el caudal y la conductividad o; controlando además la temperatura y/o la iluminación, el nivel de partículas y/o el CO₂ en la atmósfera que rodea al FACI.

La biomasa de consorcio que contiene al menos una especie de microalga y una especie cianobacteria, de medio marino, terrestre o de agua dulce.

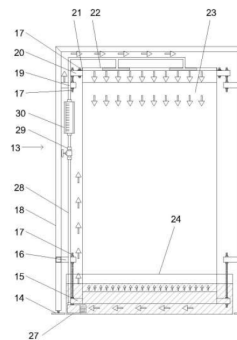


FIGURA 13

DESCRIPCIÓN

Método de cultivo, sistema de cultivo y biomasa de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm con fines industriales.

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención pertenece al sector de la industria de las microalgas y cianobacterias y más concretamente a los métodos y a los sistemas de producción de biomasa.

10

El objeto principal de la presente invención es una metodología y un sistema que permiten cultivar de manera combinada (en consorcio *ad-hoc*) una amplia gama de especies de microalgas y cianobacterias en biofilm, con la que se obtiene una biomasa que contiene diversos Compuestos Bioactivos de Alto Valor (CAVAS) que son de interés para la industria, en especial la industria cosmética.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Métodos de cultivo de microalgas y cianobacterias

20

Los métodos de cultivo de microalgas y cianobacterias con fines de producción de biomasa se realizan utilizando técnicas de microbiología y procedimientos de escalado industrial para aumentar los volúmenes de producción. El proceso se inicia a partir de una cepa de una especie, procedente de una colección pública o privada, que es cultivada en volúmenes pequeños y posteriormente se escala a mayores volúmenes de cultivo. Durante este proceso, existen diversas metodologías para el control de los principales parámetros fisicoquímicos que intervienen en el cultivo: temperatura, iluminación, suministro de CO₂ y fuente de nutrientes.

25

Dodd et al (2014), en US 2014/0051131 A1, describen un método para el monocultivo de especies de microalgas o cianobacterias con fines de producción de biomasa, optimizando la producción a partir de estímulos de iluminación controlada. En estas condiciones es posible incrementar la producción de ciertos metabolitos. Entre las especies que se citan están *Chlorella sp*, *Synechococcus sp* y *Trachidiscus sp*.

30

En ocasiones las microalgas son cultivadas en ausencia de luz. En US8557249 B2, Brooks & Franklin (2013) reivindican un método para la producción de microalgas por medios

35

heterotróficos para la obtención de biomasa con fines cosméticos, proporcionando como ejemplo el cultivo de *Chlorella sp.*

5 Ganuza et al (2014), en WO 2014074769 A2, han desarrollado un método para el cultivo no axénico (no puro) de microorganismos en condiciones mixotróficas en el que intervienen las microalgas. Los autores describen, además, un método para el control del crecimiento de bacterias y aumento de la productividad utilizando oxígeno. Esta invención reivindica el uso de una fuente de carbono y suplemento de sales como fuente nutritiva, el uso de tanques de cultivo, control de pH y fotoperíodo y la fuente de iluminación. Pese a las mejoras sobre el control de las condiciones de cultivo, este sistema no contempla el desarrollo de consorcios *ad hoc* de microalgas y cianobacterias.

15 De particular interés para la presente invención, Le Bihan et al. (2014), en US20140356931 A1, describen un método y un sistema de tanque fotobiorreactor abierto para la producción de microalgas, basado en el principio de consorcio de al menos dos especies de microalgas. Con este sistema se controla la iluminación y, además, se favorece los procesos de floculación para la cosecha, sin afectar el crecimiento de las microalgas en el medio de cultivo. Este sistema subraya las ventajas de cultivo de consorcios, sin embargo, solamente establecen el cultivo de microalgas y no la asociación con cianobacterias. Además, para controlar la calidad de los cultivos no se describe la manera de establecer los consorcios.

25 En la presente invención se describe un método para el cultivo de consorcios *ad-hoc* de al menos una microalga y una cianobacteria en biofilm, que garantiza la trazabilidad, desde el cultivo de las especies en condiciones axénicas en laboratorio hasta el cultivo de consorcios *ad-hoc* en foto-fermentadores.

Sistemas de cultivo de microalgas y cianobacterias

30 Los sistemas que se utilizan para el cultivo de microalgas o cianobacterias constan de un contenedor o un sustrato, denominado foto-biorreactor o Foto-fermentador, dentro del cual se dispone de un medio de cultivo al que se incorporan sustancias nutritivas (sales inorgánicas y/o compuestos orgánicos), una fuente de iluminación y una fuente de CO₂.

35 Estos sistemas de producción de microalgas y cianobacterias se clasifican en dos grandes grupos: los sistemas abiertos y los sistemas cerrados.

Los sistemas abiertos son aquellos en donde las microalgas crecen en contacto con el aire y

donde existe la posibilidad de contaminación por otros microorganismos. Así mismo, los cultivos están expuestos a los cambios de temperatura, pluviosidad e insolación del medio ambiente circundante. Por lo general, tienen un gran consumo de agua y baja productividad, aunque tienen bajo coste de construcción y mantenimiento.

- 5 Los sistemas abiertos más utilizados son tanques rectangulares o circulares de escasa profundidad. Las principales especies que se cultivan con estos sistemas son: *Arthrospira platensis* (*espirulina*), *Dunaliella salina*, *Hematococcus pluviatilis*. Estas especies suelen crecer en medio líquido en condiciones extremófilas, lo que reduce las probabilidades de contaminación por otros microorganismos.

10

Una variante de los sistemas abiertos lo constituye los bioreactores de células inmovilizadas. Este tipo de sistemas permiten reducir el uso de agua, son de bajo coste económico y suelen ser fácilmente escalables. Pese a estas ventajas este tipo de sistemas no consideran métodos de control de la producción de las especies en cultivo. Algunos ejemplos son:

- 15 Plitt et al. 1996 describen, en US5585266 A, un sistema conformado por un panel de tejido de fibras naturales o artificiales contenido en un marco bastidor cerrado, estanco al aire y al agua. Fernández (2011), en WO2011/138477 A1, presenta un sistema similar, pero no estanco al aire y al agua con una cámara interior para la difusión de gases. Con este tipo de foto-bioreactores se mejora la productividad respecto a los otros sistemas abiertos, gracias a la aportación de
- 20 CO₂ desde el interior.

- Gross & Wen (2014) en US 20140273171 A1 describe un mecanismo con el que los paneles se hace pasar un medio líquido utilizando un sistema de poleas y un motor para generar el movimiento del tejido. Con este sistema, además, se automatiza la recogida de las microalgas y se indica que es idóneo para el monocultivo de diversas especies de microalgas y
- 25 cianobacterias, sin embargo, no se presenta como un sistema escalable industrialmente.

- Por otra parte, los sistemas cerrados consisten en foto-bioreactores aislados del contacto con el medio externo y en donde se desarrolla el cultivo en condiciones controladas de temperatura, iluminación, salinidad e intercambio de gases. En estos sistemas se incrementa la
- 30 productividad de las especies que están siendo cultivadas en régimen de monocultivo. Según Enzing et al. (2014. *JRC Scientific and policy reports*). las especies que más se cultivan en estos sistemas son: *Nannochloropsis sp*, *Phaeodactylum sp*, *Nitzschia sp*, *Cryptocodinium sp*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus almeriensis*, *Coelastrella striolata*.

- 35 De manera general, los sistemas cerrados suelen requerir de elevado coste de inversión, presentan un alto gasto energético y están diseñados para la producción de especies en

régimen de monocultivo.

En la presente invención se describe un sistema de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm. Este es un sistema de cultivo abierto de células inmovilizadas, con la ventaja de presentar bajo coste de operación y escalabilidad. Además, tiene la ventaja de operarse como otros sistemas cerrados, controlando las variables de cultivo (temperatura, intercambio de gases, pH, salinidad, caudal de agua, entre otros). Estas ventajas favorecen el rendimiento de la producción, y el control de la calidad de la biomasa que se produce.

El cultivo de consorcio *ad-hoc* genera asociaciones beneficiosas entre microalgas y cianobacterias para promover unas características bioquímicas particulares en la biomasa del producto final. Los CAVAS que se obtienen proceden de las propias especies y además de la matriz extracelular que se forma, producto de la interacción entre ellas.

La base conceptual del cultivo de consorcios *ad-hoc*, de esta invención, procede del hecho de que es bien conocida la cooperación mutualista entre las microalgas y las bacterias. En esta cooperación ocurre intercambio de nutrientes y dinámicas interacciones a través de señales moleculares que pueden ir en beneficio o detrimento del desarrollo entre especies. Cooper & Smith (2015. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 26) y Unnithan et al. (2014. *Algal Research*, 4) dan cuenta en diversos ejemplos de cooperación entre especies de microalgas y cianobacterias. Uno de los principales retos de la industria de las microalgas es aprovechar estas interacciones mutualísticas para beneficiarse de posibles escenarios para mejorar el rendimiento del cultivo y obtener nuevos CAVAS (Cooper & Smith, 2015, *op. cit.*).

Estos fenómenos de interacción entre microorganismos en consorcio se manifiestan como una comunicación a través de señales moleculares y son conocidos como “quorum sensing” (Bassler, 2002. *Cell* (109); Dobretsov et al. 2013. *Biofouling* (25); Montgomery et al. 2013. *Life (Basel)* 3(1)). Este fenómeno es tipificado en la formación de biofilms por la dependencia de la densidad celular y normalmente ocurre cuando se alcanza un número crítico de individuos en cada especie.

En la presente invención se utiliza un método y un sistema para el cultivo de consorcios *ad-hoc* de especies de microalgas y cianobacterias que conforman un biofilm, en el que las especies que intervienen han sido seleccionadas a propósito.

Biomasa de microalgas y cianobacterias en biofilm con fines industriales

Las microalgas y cianobacterias están siendo objeto de cultivo en diversos países y son

5 utilizados como ingredientes para alimentación animal, para alimentación humana (suplementos, nutracéuticos, antioxidantes, vitaminas, entre otros) y para la producción de CAVAS como lípidos, proteínas, azúcares, minerales, vitaminas, pigmentos, polímeros y otras moléculas de aplicación en la industria cosmética, farmacéutica, la industria química, la industria de la energía y la industria de los materiales.

10 Encontramos diversas especies que están siendo producidas para su aprovechamiento industrial. WIPO, OMPIC & MASCIR. (2016. www.wipo.int/edocs) y Priyadarashani & Rath (2012. *J. Algal Biomass Utiln* 3 (4)) realizan una síntesis de las principales especies de microalgas y cianobacterias que han sido objeto de patente en la industria en general, incluyendo la industria cosmética. Las especies más utilizadas en la industria cosmética son: *Arthrospira platensis*, *Chlorella sp*, *Nannochloropsis oculata* y *Dunaliella salina*. Existen otras especies que están siendo utilizadas, como son: *Phaedactylum tricorutum*, *Skeletonema costatum*, *Rhodosorus marinus* y *Dysmorphococcus globosus* (fuente propia).

15 En la industria cosmética, la biomasa de las microalgas o las cianobacterias está siendo utilizada como producto o como ingrediente de productos, debido a diversos efectos cosméticos reivindicados por los productores. Así, por ejemplo, algunas especies destacan su efecto antiedad, antiarrugas, exfoliante, revitalizante, reafirmante o antienvejecimiento de la piel (Wang et al 2015. *Bioresour Technol.* ;184). Estas reivindicaciones están sustentadas en el efecto de los CAVAS presentes en cada una de ellas de manera individual.

25 Algunos de los CAVAS con actividad biológica son: la vitamina E, la vitamina C, los ácidos grasos poliinsaturados (especialmente ácido linoléico y Alfa linoléico), los polifenoles y los minerales como el Zinc, Selenio, Magnesio. Estos CAVAS actúan para promover las reivindicaciones cosméticas citadas previamente. Estos compuestos están presentes en las microalgas y cianobacterias cumpliendo diversas funciones celulares junto a otros compuestos más complejos como son los pigmentos: clorofilas, ficobilinas, ficoeritrinas y beta-carotenos.

30 Las microalgas y cianobacterias son ricas en antioxidantes, lo que las hace idóneas para combatir el envejecimiento, así como en los cambios degenerativos de los diferentes órganos (Datla, 2011. <http://www.valensa.com/images3>). Según WIPO, OMPIC & MASCIR (2016. *op.cit.*) los pigmentos, polisacáridos y proteínas en las microalgas y cianobacterias son los principales productos que han sido registrados para su uso cosmético.

35 Las vitaminas son de gran importancia para el bienestar de la piel. Según Angelo (2012. Linus

Pauling Institute) el retinol (vitamina A) es una de las vitaminas que mejor se absorben en este tejido; tanto en la epidermis como en la dermis existen proteínas y receptores que intervienen en el metabolismo de esta vitamina. Esta vitamina participa en la reducción de arrugas finas, incrementa la hidratación de la piel y disminuye la hiperpigmentación.

5
La vitamina C contribuye a la síntesis del colágeno y tiene excelentes propiedades como antioxidante, previendo el daño producido por la luz solar (Michael & Draelos, 2011. Linus Pauling Institute). La vitamina C es deficitaria con la edad y a mayor exposición a la radiación solar. El uso de productos (por vía oral o cutánea) que contengan vitamina C, como son las
10 microalgas, podría contribuir a incrementar los niveles de este compuesto.

La vitamina E es en esencia un antioxidante que actúa contra las moléculas reactivas al oxígeno (ROS, en sus siglas en inglés). Es capaz de absorber energía de los rayos ultravioleta y actúa también como antiinflamatorio (Michael & Traber, 2012. *Linus Pauling Institute*). Rhee et
15 al (2001. *J. Invest Dermatol.* 117) subraya la importancia de esta vitamina en la epidermis y la dermis y su función protectora contra los rayos UV. Así mismo destaca la importancia en el mantenimiento del potencial redox en la piel.

Diversas especies de microalgas presentan un perfil de vitaminas mucho más elevado que
20 otros alimentos convencionales. En general son ricas en vitaminas liposolubles. Las vitaminas A, C y E se encontraron en altas concentraciones comparado con el contenido en vitaminas de otros alimentos tradicionales (Fabregas & Herrero, 1990. *J. of Industrial Microbiology* 5(4)). Estos autores encontraron en especies como *Tetraselmis suecica*, *Chlorella stigmatophora* y *Dunaliella tertiolecta* un contenido de 493.750; 82.300 y 137.500 IU / kg de vitamina A
25 respectivamente; 421,8; 669,0 y 116,3 mg/kg de vitamina E respectivamente y 191,0; 100,2 y 163,2 de vitamina C respectivamente.

Los pigmentos tienen una potente capacidad antioxidante y son naturalmente abundantes en las microalgas y cianobacterias. Estos microorganismos están sometidos a altos niveles de
30 radiación ultravioleta, sin embargo, sus pigmentos actúan como protector contra la radiación. Lanfer-Marquez et al. (2005. *Food Research International* 38) estudian el efecto antioxidante de las clorofilas, carotenos y otros pigmentos derivados. En su estudio concluyen que el efecto antioxidante es debido a su capacidad para proteger los ácidos grasos de la oxidación y prevenir la descomposición de los hidroperóxidos. Ferruzzi & Blakeslee (2007. *Nutrition
35 Research* 27) describen los principales avances sobre el conocimiento del efecto de la clorofila y sus derivados (clorofila a, clorofila b, feofitinas y pirofeofitinas) sobre la salud. Estas

sustancias contribuyen a la prevención del cáncer, son antioxidantes y antimutagénicas.

Los compuestos polifenólicos son considerados uno de los antioxidantes naturales más potentes. En las plantas, estos compuestos cumplen funciones de fotoprotección y además protección frente a patógenos. En humanos se ha constatado su efecto terapéutico como anticancer, antioxidante, antibacterial, antialérgico, antidiabetes, Antiedad, antiinflamatorio y cierta actividad anti VIH (Tomas & Kim, 2011. *Environ. Toxicol. Pharmacol* (32)). Angelo & Stahl (2012. *Linus Pauling Institute*) subrayan que estos compuestos pueden absorber la radiación UVB e inhiben enzimas que participan en procesos de inflamación dérmica relacionados con la exposición a la radiación solar.

Machu et al (2015) encontraron compuestos polifenólicos en la microalga *Chlorella pyrenoidosa* y en la cianobacteria *Arthrospira platensis* en concentraciones de 18,2 y 43,2 mg / g respectivamente.

El envejecimiento prematuro es debido a múltiples factores que combinados producen el deterioro celular. La presencia de radicales libres procedentes de los alimentos, los rayos ultravioleta, la polución del aire son la principal causa de los daños celulares. Capello (2009) explica en US 7473427 B2, como ciertos componentes presentes en las cianobacterias actúan como promotores de la regeneración de células madre y Capello (2014) las incorpora como ingrediente en una formulación antiaging.

Los ácidos grasos poliinsaturados ω -3 y ω -6 participan en el desarrollo del tejido neuronal y además participan en la prevención de varias enfermedades en general y especialmente a nivel de la piel (Gogus y Smith, 2010. *Int. J. of Food Sc. and Tech.* (45)). Estos compuestos son muy importantes para mantener la integridad de los tejidos, en particular; participan como agentes terapéuticos a nivel de la rehabilitación de la piel, debido a su efecto retardador del envejecimiento. El ácido linolénico (GLA) es un nutriente esencial para la síntesis de prostaglandinas de la membrana celular por la vía de ciclo y lipooxigenasa, para el sistema inmune y otros procesos. Por ejemplo, en US8557249 B2, Brooks & Franklin, 2013 describen el uso del extracto lipídico o de las células completas de *Chlorella* para el desarrollo de productos cosméticos.

La presente invención reivindica la producción de una biomasa en consorcio de microalgas y cianobacterias en biofilm. La condición de consorcio le confiere a la biomasa una composición bioquímica más compleja y diversa, comparada con la que puede tener la biomasa de una especie en monocultivo. El cultivo de consorcio somete a las especies a interacción, de

competencia y /o cooperación por recursos nutritivos en el medio de cultivo. Esta interacción es de carácter química y de ella resulta la generación de nuevos CAVAS que incrementan la acción cosmética del producto final.

5 EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

La descripción de la invención está dividida en dos epígrafes. La sección I.; Definiciones; especialmente indicado para los no expertos y la sección II.; Detalles de la invención. En esta sección se describe en el apartado A. Método de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm; en B. Sistema de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm y en C. Biomasa de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm.

I. DEFINICIONES

Las definiciones descritas a continuación son ampliamente aceptadas por expertos de la materia. Algunas de ellas se encuentran referenciadas algunas referencias bibliográficas: Richmond (2004. *Blackwell Publish. Oxford*); Enzing et al. (2014. op. cit.).

Axénico: referido a cultivo de microorganismos, como las microalgas o cianobacterias, de una sola especie en ausencia de otras especies contaminantes.

Biofilm: película o capa de material de origen biológico conformada por moléculas orgánicas de origen microbiano que albergan microorganismos que se desarrollan en común (bacterias, microalgas, hongos, entre otros)

CAVAS: compuestos activos de alto valor. También se definen como moléculas de carácter estructural o de reserva, constituyentes de las células, en este caso referido a las microalgas o a las cianobacterias. Se pueden considerar CAVAS a moléculas como: las proteínas, lípidos, hidratos de carbono, minerales y además componentes completos; o componentes fraccionados, tales como aminoácidos, péptidos; o conformando compuestos más complejos, tales como pigmentos, vitaminas y otros.

Cianobacteria: son organismos procariotas; bacterias conocidas como algas azul-verdosas por ser portadoras de pigmentos y tener capacidad fotosintética. Viven de manera individual o de forma colonial.

Consortio ad hoc: hace referencia a una asociación de especies de microorganismos de grupos taxonómicos diferentes (microalgas, cianobacterias, hongos, levaduras, entre otros), que se realiza de manera deliberada, para lograr la proliferación de las especies y generar un

rendimiento en biomasa de entre 1,2 y 4 g/m²/día. Estas interacciones dan lugar a un equilibrio dinámico de la comunidad microbiana.

5 *Equilibrio de quórum*: concepto acuñado en esta invención para describir la etapa de mayor crecimiento de la biomasa, en donde la densidad celular de cada especie alcanza su estado de equilibrio.

Foto-fermentadores: son dispositivos, abiertos o cerrados, provistos de iluminación, natural o artificial, utilizados para el cultivo de microalgas y cianobacterias. También son conocidos como foto-biorreactores.

10 *Heterotrófico*: referido a cultivo de microorganismos, como las microalgas o cianobacterias, en donde se proporcionan una fuente de carbono como fuente de alimentación.

Ingrediente cosmético: es una sustancia que constituye una fórmula más compleja, de un producto cosmético final. En este caso, la biomasa de microalgas constituye un ingrediente cosmético.

Metabolito (molécula bioactiva): Véase CAVAS.

15 *Microalgas*: son organismos eucariotas portadores de pigmentos y con capacidad fotosintética. Viven de manera individual o de forma colonial.

Mixotrófico: referido a cultivo de microorganismos, como las microalgas o cianobacterias, en donde se proporcionan condiciones adecuadas para que los microorganismos consuman alimento directamente del exterior (heterotrofia) o la produzcan ellos mismos (autotrofia).

20 *Monocultivo*: cultivo de una sola especie. En el caso de esta invención se trata de cultivos de una sola especie de microalga o cultivos de una sola especie de cianobacteria.

Quorum sensing: es un tipo de comunicación celular entre microorganismos que regula la expresión génica y la densidad celular interespecífica de cada población.

25 *Sala blanca*: o sala limpia es un espacio cerrado diseñado para obtener bajos niveles de contaminación, a través del control de la calidad del aire, la temperatura, la humedad y las partículas en suspensión.

II. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A Método de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm.

Este método de cultivo de consorcio *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm conlleva
 5 varias etapas (figura 1) a través de las cuales se cultivan las especies de manera individual y
 posteriormente en consorcio. Estas etapas incluyen: A1. La elaboración del medio de cultivo
 (1); A2. La incubación de cepas puras (2); A3. La preparación de cultivo de arranque (3); A4. El
 procedimiento de cultivo de consorcios *ad-hoc* de especies en Foto-fermentadores Abiertos de
 células inmovilizadas (FACI) (4); A5. El cosechado y el procesado de la biomasa en consorcio
 10 (5 y 6); A6. El control de calidad de la biomasa en consorcio.

Las principales ventajas del método de esta invención son las siguientes:

- ✓ El método de cultivo de consorcios *ad-hoc* permite integrar cultivos puros de especies
 de microalgas y cianobacterias, siendo, hasta el momento el único método que es
 utilizado para este fin.
- 15 ✓ El método descrito permite realizar distintas combinaciones *ad-hoc* de especies,
 mejorando el control de la aparición de otras especies, como ocurre con métodos de
 cultivos abiertos tradicionales de microalgas y cianobacterias.
- ✓ El método mejora la trazabilidad del proceso productivo, respecto a los cultivos abiertos
 y cerrados tradicionales, porque el medio de cultivo se puede fabricar, controlando las
 20 sales básicas y nutritivas que utilizan las microalgas para crecer.
- ✓ El método permite obtener una biomasa de consorcio de especies, con una
 composición bioquímica más compleja porque está compuesta de los metabolitos de
 cada especie, de microalgas y cianobacterias, y por los metabolitos producidos por la
 interacción entre las especies en el medio de cultivo.

25 A continuación, se describe cada una de las etapas del método de cultivo de consorcios *ad-
 hoc*:

A1. Elaboración del medio de cultivo (1):

El medio de cultivo se prepara con una formulación básica y una formulación nutritiva. La
 primera incorpora los electrolitos necesarios para configurar el medio de cultivo para las
 30 especies en consorcio; la segunda aporta los nutrientes necesarios para el crecimiento de las
 especies en consorcio. La combinación de la formulación básica y la formulación nutritiva

permiten establecer las condiciones óptimas de conductividad y salinidad para el cultivo de los consorcios de microalgas y cianobacterias de agua dulce, de agua de mar o aguas duras (figura 2). Estos medios de cultivo son necesarios para el desarrollo de las etapas ulteriores del método de la invención.

- 5 La forma de realización preferente de la formulación básica para el agua dulce, hasta alcanzar una conductividad deseada (figura 2), se logra a partir de la combinación de las siguientes sales en proporción variable, según los requerimientos de las especies de microalgas o cianobacterias en cultivo: CaCO_3 (40 a 30%), NaHCO_3 (20 a 10%), Mg SO_4 (10 a 5%), NaCl (5 a 3%), y KCl (5 a 2%). La forma de realización preferente para la formulación nutritiva para consorcios de agua dulce y de aguas duras utiliza una formula modificada de otros medios nutritivos convencionales para microalgas y cianobacterias: Medio de Rodríguez – López (Rodríguez- López, 1978. *Medio nutritivo*), medio Bold Basal (Bischoff & Bold, 1963, *University of Texas Publications no., 6318*) y medio nutritivo para cianobacterias ASN-III + solución traza A5+Co (Rippka, 1988. *Meth Enzymol 167*).
- 10
- 15 La forma de realización preferente de la formulación básica para el agua de mar comprende una mezcla de sales, hasta alcanzar la conductividad deseada (figura 2), con las siguientes sales en proporción variable, según los requerimientos de las especies de microalgas o cianobacterias en cultivo: NaCl (60 a 80%); $\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ (6 a 8%); Mg Cl_2 (4 a 6%); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 a 3%); KCl (0,5 a 1%) y NaHCO_3 (0,5 a 1%). La forma de realización preferente para la formulación nutritiva para consorcios de agua de mar utiliza una mezcla de medios nutritivos para microalgas y cianobacterias marinas: Medio de Miguel (Allen-Nelson, 1910. *Kinne Eds. Marine Ecology, III*), medio guillard F $\frac{1}{2}$ (Guillard, 1973. *Cambridge, Universa Press*) y medio nutritivo para cianobacterias marinas: ASN-III + solución traza A5+Co (Cyanosite.bio).
- 20

A2. Incubación de cepas puras (2):

- 25 Esta etapa permite mantener en condiciones axénicas las cepas de microalgas y cianobacterias. Estas cepas pueden obtenerse de centros oficiales o pueden ser aisladas directamente del medio natural. La renovación de los cultivos puros se realiza cada mes y cada dos meses, para los cultivos en medio líquido y para los de medio sólido respectivamente. Este tipo de cultivos permiten conservar las cepas para su uso, cada vez que sea necesario iniciar un nuevo cultivo de arranque.
- 30

La forma de realización preferente para el cultivo de cepas puras de agua marina, aguas duras y de agua dulce se realiza utilizando los mismos medios nutritivos citados anteriormente. Se realizan cultivos en medio sólido, en un soporte cajas de Petri, y en medio líquido, en

volúmenes de entre 10 y 125 ml en tubos de ensayo y erlemmeyers. Los medios líquidos y sólidos se esterilizan con técnicas clásicas de microbiología. Las condiciones fisicoquímicas de incubación de las cepas (figura 2) son de al menos 18°C, un fotoperíodo de entre 16:8 (luz: oscuridad) y una irradiancia de entre 30 a 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$ en incubadora.

5 *A3. Preparación de cultivos de arranque (3):*

A partir de las cepas puras en medio líquido se inician los cultivos de arranque. Estos cultivos se realizan de forma independiente de cada una de las especies de microalgas y de cianobacterias que van a ser incorporadas al consorcio. El cultivo de estas cepas se realiza hasta que cada especie alcanza el estado de fase exponencial de crecimiento, lo que ocurre entre 7 y 12 días, según las especies.

La forma de realización preferente para el cultivo de arranque consiste en cultivar cada una de las cepas puras, pasando de un matraz de al menos 125 ml a botellas de al menos 500 ml y luego de más de 3 litros. Los cultivos de arranque se realizan en botellas de cristal, con suministro de aire filtrado por filtro de cartucho de 0,45 μm , a más de 22°C de temperatura, de 15 fotoperíodo en torno a 16:8 (luz: oscuridad) y una irradiancia de entre 1.000 y 2.000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$ en incubadora.

A4. Procedimiento de cultivo de consorcios ad-hoc de especies de microalgas y cianobacterias en Foto-fermentadores Abiertos de Células inmovilizadas (FACI) (4):

En esta etapa se combinan el medio nutritivo y los cultivos de arranque, obtenidos en los pasos anteriores, de al menos una especie de microalga y una especie de cianobacteria. Periódicamente es necesario realizar labores de mantenimiento y alimentación con medio nutritivo y cosecha.

La forma de realización preferente del método de cultivo en FACI se describe a continuación.

1. Hidratación del sustrato fibroso polimérico: se incorpora el medio de cultivo, compuesto de al menos 30 lt de la formulación básica y las sales de la formulación nutritiva, para que el panel absorba el agua y tenga lugar la adhesión de sales minerales en el sustrato (10). Estas sales proceden del medio de cultivo (formulación básica y formulación nutritiva). Esta etapa debe realizarse en un período de 24 a 48 horas.
2. Mezcla de cultivos de arranque: se realiza la mezcla de cultivos de arranque de las microalgas y cianobacterias en el depósito del FACI que contiene al menos 30 litros del medio de cultivo. El primer paso es incorporan entre 3 y 6 litros de cultivo de arranque de al menos una especie de cianobacteria. Pasados 48 horas, una vez las cianobacterias haya

colonizado el sustrato fibroso (figuras 4), se incorporan entre 3 y 6 litros de al menos una especie de microalga. En este punto las cianobacterias forman un entramado de fibras que favorecen la fijación pasiva de conglomerados de microalgas, para dar lugar a la estructura final del consorcio de microalgas y cianobacterias en biofilm (11) (figura 4).

- 5 3. Alimentación y mantenimiento de cultivos en FACI: para garantizar el desarrollo del consorcio es necesario incorporar las sales de la formulación nutritiva al menos cada 3 días y realizar la limpieza del FACI cada 10 días. A partir de los 35 días se considera establecido el consorcio, cuando las especies alcanzan “un equilibrio de quórum”. Este estado se define como el momento a partir del cual la biomasa obtenida regularmente se
- 10 mantiene sin variaciones, en cuanto a composición de especies (figura 5) y en cuanto a productividad. La productividad media de este tipo de consorcios se establece entre 1,48 y 4 gr de materia seca / m² de sustrato / día, según las especies que intervengan en el consorcio.

En la forma de realización preferente la temperatura, la iluminación y el caudal de cultivo en

15 FACI se mantienen según se describe en la figura 2 y las sales nutritivas para agua dulce, agua de mar o agua dura, según las especies de cultivo como se describe en los epígrafes A1.

En otra forma de realización preferente se puede modificar el medio de cultivo si se pretende obtener determinados CAVAS en la biomasa en consorcio final. Por ejemplo, para incrementar el contenido en proteínas se aumenta en proporción el contenido en solución de nitratos en

20 relación 4:1 respecto al resto de los medios nutritivos. En el caso de incrementar el contenido en lípidos totales se incorpora cualquier fuente de carbono orgánico (por ejemplo: glucosa o glicerol) en relación 1:1 con la solución de nitratos.

En otra forma de realización preferente se puede modificar la iluminación, cuando se pretende realizar el cultivo en FACI en atmósfera controlada (sala blanca). Se incorpora iluminación LED

25 combinando longitud de onda roja (660 nm) y azul (420 a 470 nm), con el fin de cumplir con los requerimientos de las microalgas y cianobacterias, cuyas necesidades de longitud de onda son diferentes debido a su composición en pigmentos fotosintéticos.

En otra forma de realización preferente se puede modificar la iluminación, cuando se pretende realizar el cultivo en FACI en atmósfera controlada (sala blanca). El cultivo se puede realizar en

30 ausencia de luz y añadiendo una fuente de carbono orgánico como suplemento alimenticio. De este modo la biomasa de consorcio modifica su forma de producción a heterotrófica, siendo especialmente indicada para la producción de lípidos de alto valor.

En otra forma de realización preferente se puede modificar la atmósfera para incorporar CO₂ con el fin de aumentar la productividad en un 30%. En esta realización el CO₂ será transferido a la atmósfera circundante a una concentración del 5%.

A5. Cosechado y procesamiento de la biomasa de consorcios (5 y 6):

5 Una vez el consorcio alcanza su máximo estado de desarrollo se procede al cosechado de las microalgas. El cosechado se realiza con el fin de obtener la biomasa en consorcio para fines de uso industrial. Una vez se realiza la cosecha, la biomasa remanente en el sustrato fibroso polimérico inicia un nuevo ciclo de producción. La biomasa cosechada se somete a varias etapas de procesado que consisten en: un pre - homogenizado, un homogenizado con
10 tecnología HPH, congelación y finalmente liofilización.

En la forma de realización preferente el método de cosechado consiste en detener el paso del medio de cultivo sobre el sustrato fibroso polimérico y dejar entre 10 minutos y 1 hora de reposo para alcanzar la máxima deshidratación, del 80 al 90%. Entonces, se procede al arrastre de la biomasa de arriba hacia abajo con una herramienta de acero inoxidable: una
15 espátula de borde liso y uniforme.

En la forma de realización preferente el método de procesado consiste en una pre-homogenización en un homogeneizador a 2000 RPM, con el fin de fragmentar al máximo las colonias de cianobacterias. Entonces, esta biomasa es sometida a un proceso de disrupción celular con la tecnología de homogenización en alta presión (HPH, siglas en inglés). Esta
20 tecnología HPH es proceso puramente mecánico que somete un fluido a pasar a través de una ranura a alta presión. Se utilizó el equipo Emulsiflex C3 (Avestin, Inc., Canadá) con una capacidad de caudal de 3 L/h. Las condiciones de trabajo utilizadas son de 2000 bares de presión y en ciclo continuo, para obtener un tamaño de partícula en el producto final de entre 2 y 10 µm. La muestra fue diluida para bajar la concentración de la biomasa para lograr una
25 condición óptima de trabajo. Finalmente, la biomasa obtenida es transferida a un congelador a -18°C y posteriormente sometida a un proceso de liofilización para que el producto final alcance un contenido de humedad menor al 5%.

A6. Control de calidad de la biomasa de consorcio:

Se realiza un control de calidad microbiológica sobre la biomasa final para la detección
30 microorganismos patógenos que puedan ser inviable el uso de la biomasa con fines industriales.

En el modo de realización preferente, para su uso en cosmética, los análisis microbiológicos que se llevan a cabo son: anaerobios mesófilos, *Cándida albicans*, *Pseudomonas aeurogionsa*, *Staphylococcus aureus*; y una determinación de metales pesados: Plomo, cadmio, arsénico y mercurio. Previo a la etapa de congelación, sobre la biomasa fresca se realiza una prueba de fitotoxinas para la detección de anatoxina-a, Nodularina y microcistinas.

B. Sistema de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm:

El sistema que se describe a continuación hace referencia a un Foto-fermentador de Células Inmovilizadas (13) que opera en condiciones abiertas al ambiente o en atmósfera controlada (sala blanca).

10 Las principales ventajas del sistema de cultivo descrito en esta invención son las siguientes:

- ✓ El Foto-fermentador Abierto de Células Inmovilizadas FACI es un sistema abierto que permite cultivar consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm, siendo hasta el momento el único sistema que es utilizado para este fin.
- ✓ El artefacto descrito simplifica la estructura de otros fotobiorreactores de células inmovilizadas, mejorando la eficiencia en las labores de siembra, cosechado y limpieza en cada ciclo de cultivo.
- ✓ EL FACI incorpora un modo de distribución de agua denominado “canal desbordante” que garantiza la uniformidad de la lámina de agua sobre el Fotofermentador.
- ✓ El FACI incorpora unos sensores que permite ajustar la tensión superficial de la lámina de sustrato fibroso polimérico, así como sumergirla parcialmente en el medio de cultivo. Esto favorece el flujo ascendente de las sales nutritivas y el crecimiento de las cianobacterias.
- ✓ EL FACI dispone de una válvula de ajuste de caudal y un caudalímetro, que permiten modificar el caudal de medio que discurre entre el sustrato y la cuba de siembra. El caudal es una variable crítica para el tipo de cultivo de consorcio *ad-hoc* que se desea obtener.

El artefacto que se describe en la invención (FACI) está especialmente indicado para el cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm.

Está compuesto por un chasis apoyado en cuatro pies de soporte y nivelado. El chasis soporta cuatro conjuntos sensores por medio de alas soporte que permiten ajustar la tensión a la que está sometida una lámina vertical de sustrato fibroso polimérico por medio del conjunto de

varilla roscada, tuercas y arandelas. La tensión superficial del sustrato es una variable que influye en el tipo de consorcio que se desea cultivar. A diferencia de la patente WO2011/138477 no dispone de marco bastidor para cámara de gases ya que no se realiza aporte de gases. Otra diferencia es la disposición semi-sumergida de la lámina de geotextil, para favorecer el flujo ascendente, lo que mejora el crecimiento del consorcio, especialmente de las cianobacterias. Adicionalmente, en la presente invención, no existe lámina de malla interna de 5mm de ojo de malla (por ambas caras), se trata de una única lámina de sustrato fibroso polimérico.

El sustrato fibroso polimérico se encuentra parcialmente sumergido, en su zona inferior, en una cuba de siembra. Esto permite, por medio de la capilaridad, la penetración de las sales nutritivas del medio de cultivo. Esta característica también favorece el cultivo del consorcio, especialmente, el crecimiento de las cianobacterias.

Adicionalmente, se realiza un vertido de medio de cultivo desde la cuba de siembra por la parte superior del sustrato. Para ello, se utiliza una bomba sumergida y una tubería que elevan el medio de cultivo hasta un canal desbordante. En dicha tubería, entre la bomba y el canal desbordante, se disponen una válvula de corte y un caudalímetro. Mediante estos elementos se puede variar el caudal elevado hasta el canal desbordante. El caudal bombeado es determinante en el proceso de cultivo, favoreciendo la aparición de un tipo de consorcio u otro.

El canal desbordante garantiza (gracias al nivelado del chasis) un reparto totalmente homogéneo del medio de cultivo sobre el sustrato fibroso polimérico ya que produce un efecto de lámina desbordante sin salpicaduras. El medio de cultivo se recircula constantemente desde la cuba de siembra hasta el canal desbordante y de ahí cae por sustrato fibroso polimérico de nuevo a la cuba de siembra.

La forma de realización preferente (figuras 7 a 13) es la construcción del chasis (18) mediante un tubo cuadrado de acero inoxidable de 40x40 milímetros y 2 milímetros de espesor. Dicho chasis se apoya en 4 pies de soporte y nivelado (14) de chapa circular de acero inoxidable de 100 milímetros de diámetro y 10 milímetros de espesor. A cada uno de dichos pies se suelda una varilla roscada de acero inoxidable de métrica 10 en el centro del disco (14). En cada varilla se inserta una tuerca y su correspondiente arandela también de acero inoxidable (14). En cada uno de los 4 tubos cuadrados de acero inoxidable (en su parte inferior) se sueldan 4 tapas en cuyo centro se realiza un taladro de 11 milímetros que permite el paso de la varilla roscada. Mediante sistema de tuerca y arandela dicha varilla habilita la variación de la altura de cada pata lo que permite nivelar perfectamente el FACI.

A fin de ajustar perfectamente la tensión superficial del sustrato fibroso polimérico (23) se disponen 4 conjuntos tensores. Tanto las alas soporte tensoras (16 y 19) como los tensores (15 y 20) se construyen con el mismo tubo cuadrado del chasis. Dichas alas se sueldan al chasis. Se realizan taladros de 11 milímetros tanto en las alas como los tensores. Estos taladros permiten el paso de las varillas roscadas que, junto con las tuercas y arandelas (17), proporcionan un ajuste milimétrico del conjunto.

Los conjuntos de varilla roscada, tuercas y arandelas (17) son idénticos a los utilizados en los pies de apoyo.

En esta forma de realización preferente, el sustrato fibroso polimérico (23) es de polipropileno. Dicho sustrato polimérico se pliega sobre sí mismo en sus dos extremos y posteriormente se cose longitudinalmente. De este modo se genera un túnel que sirve para colgar el sustrato fibroso por medio de los tensores superior (20) e inferior (15).

Así mismo, sobre el tensor superior se monta el canal desbordante (22) consistente en un perfil en U de acero inoxidable de 40 milímetros de ancho y 20 de alto por 3 milímetros de espesor. En los extremos de este canal se sueldan dos pletinas en ángulo de 90° para cerrar el mismo. En cada una de estas pletinas (en su cara no soldada al canal desbordante) se realiza un taladro de 11 milímetros. Nuevamente, a través de dichos taladros mediante varilla roscada, tuercas y arandelas se fija el canal desbordante al tensor superior.

En esta forma de realización preferente, el medio de cultivo es contenido en una cuba de acero inoxidable (24) con una capacidad total de entre 10 y 150 litros. El acero inoxidable tiene un acabado superficial 2B. Para mejorar la limpieza de la cuba, una forma de realización aún más preferente es la utilización de un acero inoxidable con acabado 2R o BA.

Gracias a la bomba sumergida (27) el medio de cultivo es bombeado a través de la tubería de PVC de 16 milímetros (28) hasta inundar de manera homogénea el canal desbordante gracias a las 4 salidas dispuestas en el mismo.

Como se ha mencionado, el control del caudal de medio de cultivo es de suma importancia. Para garantizar dicha regulación, se dispone una válvula de ajuste de caudal de PVC (29) y un caudalímetro (20).

En otra forma de realización preferente se puede utilizar, como sistema de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm, otro tipo de fotobiorreactores, tales como: fotobiorreactores abiertos: lagunas, estanques y raceway; o fotobiorreactores

cerrados: bolsas, cilindros tubulares, paneles planos de plástico o metacrilato, en vertical y/o horizontal y airlift, todos estos, con las variantes posibles que cada uno de ellos.

C. Biomasa de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm:

5 El tercer aspecto de esta invención hace referencia a la biomasa de consorcios de al menos una especie de microalga y una especie de cianobacteria. Además, podrían estar presentes otros grupos de microorganismos (otras bacterias, mohos y levaduras) pero siendo tan solo < 5% de la biomasa. Esta biomasa es obtenida con el método y el sistema detallados anteriormente.

Las principales ventajas de la biomasa de consorcios descrito en esta invención son las siguientes:

- 10 ✓ La biomasa de consorcios puede realizarse con especies de interés comercial cuyas propiedades sean complementarias para determinadas aplicaciones industriales.
- ✓ En cuanto a la productividad, la biomasa de consorcios, alcanzan un equilibrio que permite obtener un mayor número de ciclos de producción comparado al de un monocultivo, sin necesidad de detener el funcionamiento de los fotofermentadores.
- 15 ✓ La biomasa de consorcios tiene una composición bioquímica más diversa que la biomasa de microalgas o cianobacterias en monocultivo. La composición de la biomasa de consorcios incluye los metabolitos de cada especie y los que se producen por la interacción de las especies en cultivo.

20 La biomasa de consorcios contiene microalgas que pueden pertenecer a los siguientes grupos taxonómicos: Chlorophyta, Rhodophyta, Glaucophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Heterokontophyta, Haptophyta, Cryptophyta y Chlorarachniophyta) y cianobacterias que pueden pertenecer a los grupos taxonómicos Cyanophyta y Prochlorales.

25 Los consorcios se especies se obtienen *ad-hoc*, mezclando especies preseleccionadas y manteniéndolas en cultivo durante un período mínimo de 30 días hasta lograr la producción de una biomasa estable. El cultivo se realiza utilizando un método (descrito en el epígrafe A4) y un sistema de cultivo (descrito en el epígrafe B), utilizando un medio de cultivo nutritivo como se describirá más adelante. Son posibles distintas modalidades de consorcios de microorganismos.

30 La forma de realización preferente de la biomasa de consorcios *ad-hoc* está compuesta por las microalgas marinas verdes *Nannochloropsis gaditana* y *Tetraselmis chuii* y la cianobacteria *Oscillatoria sp.*, y se ha denominado Marine Algaemass (11). Esta biomasa alcanza un alto

rendimiento en producción (1,6 gr de materia seca/m²/día), cuando el consorcio de especies alcanza un estado de equilibrio en la densidad de celular (12), a los 30 días aproximadamente. Este estado, que hemos denominado “equilibrio de quórum” se alcanza durante el ciclo de cultivo.

5 Otras modalidades de consorcio que se pueden obtener son las siguientes:

- microalgas diatomeas marinas: *Navicula sp*, *Pinnularia sp* y la cianobacteria *Oscillatoria sp*. Esta modalidad está dominada por la biomasa de diatomeas, en donde su contenido en silicio orgánico es altamente elevado.
- microalgas marinas diatomeas y flageladas: *Skeletonema costatum*, *Monochrysis luteri* e *Isochrysis galbana* y la cianobacteria *Moorea sp.*;
- 10 • microalgas de agua dulce: *Ullothrix sp*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus sp* y la cianobacteria de agua dulce *Pseudolyngbya sp*. Esta modalidad de biomasa presenta un alto contenido de fibra celulosa y tiene un gran potencial para aplicaciones en biomateriales;
- 15 • microalgas de agua alcalina extremófila (en medio de cultivo con pH superior a 10): *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp*; y la cianobacteria. *Arthrospira platensis*;
- microalgas marinas en medio de cultivo con salinidad > 90 ppm: *Dunaliella salina*, *Nannochloropsis gaditana*, *Phaeodactylum tricornutum* y la cianobacteria: *Halospirulina sp*;

20 Se ha estudiado la composición bioquímica de la biomasa Marine Algaemass.

La biomasa de la forma de realización preferente contiene en fracción de peso seco entre 60,9 y un 35,7 % de proteína total; 45,7 y 0,7% de lípidos totales; 30,5 y 12,4% de hidratos de carbono; 10,15 y 5,14% de sales y 20,50 y 17,4 % de fibra alimentaria (31) (Figura 14).

25 En la fracción proteica se identificaron 4 tipos de aminoácidos de gran interés por su elevada concentración (32) (Figura 16). Entre los aminoácidos esenciales destaca el elevado contenido en Leucina (9 %). Este aminoácido tiene funciones especiales en la cosmética como ingrediente de fragancia, agente acondicionador del cabello y acondicionador de la piel. Entre los no esenciales destaca el elevado contenido en ácido aspártico y glutámico (13,2%). Estos aminoácidos tienen funciones especiales en la cosmética para la elaboración de cremas
30 revitalizantes para la piel.

El cromatograma de ácidos grasos (33) (Figura 16) reveló un elevado contenido de ácido palmítico (43,95%) y ácido linolénico (17,08%). Este perfil es especialmente abundante en las especies de cianobacterias. El ácido palmítico es utilizado en cosmética como ingrediente de

fragancia, agente de opacidad, surfactante, agente limpiante, emulsificante y emoliente. Este ácido está considerado en el ranking como uno que tiene más utilidad en cosmética, según EWG cosmetic database.

5 Se realizó la extracción de vitaminas por el método de HPLC y LC-MS/MS. El contenido de vitaminas es variable (34) (Figura 17), sin embargo; destacan por su elevado contenido en vitamina E (71 mg/kg) y C (69 mg/kg), que representaron en conjunto el 88,5% del total de vitaminas.

10 El contenido en pigmentos de la biomasa Marine Algaemass (35) (Figura 18) fue extraído por el método HPLC. Los principales pigmentos encontrados fueron la clorofila A (180 mg/kg) y el beta-caroteno (79,52 mg/kg), sin embargo; en su composición también destacan T- luteína (33,09 mg/kg), cantaxantina (11,79 mg/kg) y clorofila C (25,30 mg/kg).

15 Tras un estudio de la composición de polifenoles, los principales compuestos encontrados fueron: 4-hidroxibenzaldehído y ácido p-cumárico, entre otros. Se cuantificó la composición de fenoles totales que fue de $67,765 \pm 11,575$ mg/mL equivalente de ácido gálico (EAG). Se realizaron pruebas de capacidad de captura de radicales DPPH cuyo resultado fue de $80,01 \pm 7,57$ equivalente de ácido ascórbico (EAA).

Probablemente la acción conjunta de estos compuestos, sumado a la presencia de los pigmentos y las vitaminas estén relacionados con la alta capacidad antioxidante de Marine Algaemass.

20 Se han identificado aplicaciones industriales de la biomasa de consorcio *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm de la forma de realización preferente (Marine Algaemass). La principal aplicación es para el campo de la industria cosmética y de la dermatología clínica.

A partir de un estudio *in-vitro* se evaluó la eficacia cosmética de Marine Algaemass mediante un screening enzimático y no enzimático sobre diversas acciones.

25 Se evaluó el potencial de capacidad des-pigmentante / protección natural UV, basada en la actividad de la enzima tirosinasa. También se evaluó el potencial reafirmante / antiarrugas basado en la inhibición de las actividades de las enzimas elastasa, hialuronidasa y colagenasa. Finalmente se evaluó la capacidad antienvjecimiento basado en la inhibición de las actividades de glicosilación, oxidación general y de peroxidación lipídica.

30 Para la ejecución de los ensayos enzimáticos y los ensayos no enzimáticos la muestra se analizó a una concentración del 0,3%. La cuantificación de los productos finales de la reacción

enzimática y no enzimática se realizó mediante espectrofotometría o fluorimetría, respecto a controles positivo y negativo.

El extracto de Marine Algaemass al 0,3% fue efectivo para inhibir la actividad de la enzima tirosinasa en un 51,48% respecto al control negativo de inhibición (CNI) (36) (Figura 19). El extracto también fue efectivo en la inhibición de la actividad de la enzima hialuronidasa en un 50,08% (37) (Figura 19).

Marine Algaemass al 0,3% presentó una actividad antiglicosilación del 34,23% (38) (Figura 19) y una capacidad antioxidante a 58,33 μ M en equivalente TROLOX (39) (Figura 19).

Estos resultados indican que Marine Algaemass muestra efectos positivos frente a diversos procesos de interés en cosmética:

- Por una parte, actúa como regenerador celular.
- Aporta luminosidad a la piel debido a la capacidad de inhibición de la enzima tirosinasa del 51,48%.
- Tiene actividad reafirmante / antiarrugas ya que protege frente a la degradación del ácido hialurónico, debido a la capacidad de inhibir la enzima hialuronidasa en un 50,08%
- Protege frente al envejecimiento prematuro, foto-envejecimiento y efectos de la contaminación gracias a su actividad protectora frente a la glicosilación y por los resultados de equivalente TROLOX.

Otras aplicaciones industriales posible de esta biomasa son:

- Acuicultura: formulación para alimentación de zooplancton y peces hervíboros;
- Pesca deportiva: formulación para elaborar cebo de pesca, con propiedades de atracción especialmente en carpfishing;

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1. Método de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm, según la realización preferente. Descripción de cada etapa del método.

Figura 2. Método de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm,

según la realización preferente. Parámetros fisicoquímicos en cada etapa del método.

- Figura 3. Método de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm, según la realización preferente. Detalle de la etapa de cultivo en FACI: asentamiento de sales nutritivas y formación del biofilm de microalgas y cianobacterias (400x). Fibra artificial del sustrato fijo (S) y Matriz de mucopolisacárido con asentamiento bacteriano (M).
- Figura 4. Biomasa de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm, según la realización preferente. Marine Algaemass compuesta por: **O.** *Oscillatoria* sp (cianobacteria), **N.** *Nannochloropsis gaditana*, **T.** *Tetraselmis chuii*.
- Figura 5. Biomasa de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm, según la realización preferente. Detalle de la composición relativa de las especies del consorcio Marine Algaemass. La flecha indica el punto de “equilibrio de quórum”.
- Figura 6. Sistema de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm, según la realización preferente.
- Figura 7 Sistema de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm, según la realización preferente. Vista frontal A: vista frontal del Fotobiorreactor Abierto de Células Inmovilizadas (FACI) sin la cuba para medio de cultivo.
- Figura 8 Sistema de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm, según la realización preferente. Sección A: sección del FACI sin la cuba para medio de cultivo.
- Figura 9 Sistema de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm, según la realización preferente. Alzado: vista lateral del FACI con la cuba para medio de cultivo.
- Figura 10 Sistema de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm, según la realización preferente. Vista frontal B: vista frontal del FACI con la cuba para medio de cultivo.
- Figura 11 Sistema de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm, según la realización preferente. Sección B: sección transversal del FACI con la cuba para medio de cultivo.
- Figura 12 Sistema de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm, según la realización preferente. Sección C: sección longitudinal del FACI con la cuba para medio de cultivo.
- Figura 13 Sistema de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm, según la realización preferente. Hidráulica: sección transversal del FACI con la cuba para medio de cultivo, bomba sumergida, tuberías, válvula de ajuste de caudal y caudalímetro.

Figura 14. Biomasa de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm, según la realización preferente. Composición proximal.

Figura 15. Biomasa de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm, según la realización preferente. Composición de aminoácidos.

5 Figura 16. Biomasa de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm, según la realización preferente. Composición de ácidos grasos.

Figura 17. Biomasa de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm, según la realización preferente. Composición de vitaminas.

10 Figura 18. Biomasa de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm, según la realización preferente. Composición de fitopigmentos.

Figura 19. Biomasa de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm, según la realización preferente. Resultados de los estudios *in-vitro* de eficacia cosmética. De arriba abajo: capacidad de inhibición de la tirosinasa, capacidad de inhibición de la hialuronidasa, capacidad de inhibición de la glicosilación y capacidad antioxidante según equivalente TROLOX de fitopigmentos.

15

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

A Método de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm

20 El modo de realización preferente de cada una de las etapas del método de cultivo de consorcio *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias (figura 1), se describe a continuación:

A1. *Elaboración del medio de cultivo (1):*

25 El medio de cultivo se prepara con una formulación básica y una formulación nutritiva. La forma de realización preferente de la formulación básica para el agua dulce, hasta alcanzar una conductividad deseada (figura 2), se logra a partir de la combinación de las siguientes sales en proporción variable, según los requerimientos de las especies de microalgas o cianobacterias en cultivo: CaCO₃ (40 a 30%), NaHCO₃ (20 a 10%), Mg SO₄ (10 a 5%), NaCl (5 a 3%), y KCl (5 a 2%). La forma de realización preferente para la formulación nutritiva para consorcios de agua dulce y de aguas duras utiliza una formula modificada de otros medios nutritivos convencionales para microalgas y cianobacterias: Medio de Rodríguez – López (Rodríguez- López, 1978. *Medio nutritivo*), medio Bold Basal (Bischoff & Bold, 1963, *University of Texas Publications no., 6318*) y medio nutritivo para cianobacterias ASN-III + solución traza A5+Co (Rippka, 1988. *Meth Enzymol 167*).

30

35

La forma de realización preferente de la formulación básica para el agua de mar comprende una mezcla de sales, hasta alcanzar la conductividad deseada (figura 2), con las siguientes sales en proporción variable, según los requerimientos de las especies de microalgas o cianobacterias en cultivo: NaCl (60 a 80%); Mg SO₄* 7 H₂O (6 a 8%); Mg Cl₂ (4 a 6%);
 5 CaCl₂*2H₂O (1 a 3%); KCl (0,5 a 1%) y NaHCO₃ (0,5 a 1%). La forma de realización preferente para la formulación nutritiva para consorcios de agua de mar utiliza una mezcla de medios nutritivos para microalgas y cianobacterias marinas: Medio de Miguel (Allen-Nelson, 1910. *Kinne Eds. Marine Ecology*, III), medio guillard F ½ (Guillard, 1973. *Cambridge, Universa Press*) y medio nutritivo para cianobacterias marinas: ASN-III + solución traza A5+Co (Cyanosite.bio).

10

A2. Incubación de cepas puras (2):

La forma de realización preferente para el cultivo de cepas puras de agua marina y de agua dulce se realiza utilizando los mismos medios nutritivos citados anteriormente. Se realizan cultivos en medio sólido, en un soporte cajas de Petri, y en medio líquido, en volúmenes de
 15 entre 10 y 125 ml en tubos de ensayo y erlemmeyers. Los medios líquidos y sólidos se esterilizan con técnicas clásicas de microbiología. Las condiciones fisicoquímicas de incubación de las cepas (figura 2) son de al menos 18°C, un fotoperíodo de al menos 12:12 (luz: oscuridad) y una irradiancia de entre 40 y 50 µmol/m²/seg en incubadora.

20 A3. Preparación de cultivos de arranque (3):

La forma de realización preferente para el cultivo de arranque consiste en cultivar cada una de las cepas puras, pasando de un matraz de al menos 125 ml a botellas de al menos 500 ml y luego de más de 3 litros. Los cultivos de arranque se realizan en botellas de cristal, con suministro de aire filtrado por filtro de cartucho de 0,45 µm, a más de 22°C de temperatura, de
 25 fotoperíodo en torno a 16:8 (luz: oscuridad) y una irradiancia entre 1.000 y 2.000 µmol/m²/seg en incubadora.

30

A4. Procedimiento de cultivo de consorcios *ad-hoc* de especies de microalgas y cianobacterias en Foto-fermentadores Abiertos de Células inmovilizadas (FACI):

La forma de realización preferente del método de cultivo en FACI se describe a continuación.

1. Hidratación del sustrato fibroso polimérico: se incorpora el medio de cultivo, compuesto de al menos 30 lt de la formulación básica y las sales de la formulación nutritiva, para que el panel absorba el agua y tenga lugar la adhesión de sales minerales en el sustrato. Estas sales proceden del medio de cultivo (formulación básica y formulación nutritiva). Esta etapa debe realizarse en un período de 24 a 48 horas.
2. Mezcla de cultivos de arranque: se realiza la mezcla de cultivos de arranque de las microalgas y cianobacterias en el depósito del FACI que contiene al menos 30 litros del medio de cultivo. El primer paso es incorporan entre 3 y 6 litros de cultivo de arranque de al menos una especie de cianobacteria. Pasados 48 horas, una vez las cianobacterias haya colonizado el sustrato fibroso (figuras 3 y 4), se incorporan entre 3 y 6 litros de al menos una especie de microalga. En este punto las cianobacterias forman un entramado de fibras que favorecen la fijación pasiva de conglomerados de microalgas unicelulares (figura 4).
3. Alimentación y mantenimiento de cultivos en FACI: para garantizar el desarrollo del consorcio es necesario incorporar las sales de la formulación nutritiva al menos cada 3 días y realizar la limpieza del FACI cada 10 días. A partir de los 35 días se considera establecido el consorcio, cuando las especies alcanzan “un equilibrio de quórum”. Este estado se define como el momento a partir del cual la biomasa obtenida regularmente se mantiene sin variaciones, en cuanto a composición de especies (figura 5) y en cuando a productividad. La productividad media de este tipo de consorcios se establece entre 1,48 y 4 gr de materia seca / m² de sustrato / día, según las especies que intervengan en el consorcio.

En la forma de realización preferente la temperatura, la iluminación y el caudal de cultivo en FACI se mantienen según se describe en la figura 2, según el medio de cultivo y las especies a cultivar. En general, la temperatura desde 22°C a 30°C, pH el fotoperíodo desde 0:24 a 24:0 (luz: oscuridad) y una irradiancia entre 0 y 3.000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$ en incubadora.

Las sales nutritivas para agua dulce, agua de mar o agua dura, según las especies de cultivo, son las mismas que se describe en los epígrafes A1.

En otra forma de realización preferente se puede modificar el medio de cultivo si se pretende obtener determinados CAVAS en la biomasa de consorcio final. Por ejemplo, para incrementar el contenido en proteínas se aumenta en proporción el contenido en solución de nitratos en relación 4:1 respecto al resto de los medios nutritivos. En el caso de incrementar el contenido en lípidos totales se incorpora cualquier fuente de carbono orgánico (por ejemplo: glucosa o glicerol) en relación 1:1 con la solución de nitratos.

En otra forma de realización preferente se puede modificar la iluminación, en el cultivo en FACI en atmósfera controlada (sala blanca). Se incorpora iluminación LED combinando longitud de onda roja (660 nm) y azul (420 a 470 nm), con el fin de cumplir con los requerimientos de las microalgas y cianobacterias, para incrementar la productividad de la biomasa de consorcios en al menos un 15%.

En otra forma de realización preferente se puede modificar la iluminación, cuando se pretende realizar el cultivo en FACI en atmósfera controlada (sala blanca). El cultivo se puede realizar en ausencia de luz y añadiendo una fuente de carbono orgánico como suplemento alimenticio. De este modo la biomasa de consorcio modifica su forma de producción a heterotrófica, siendo especialmente indicada para la producción de lípidos de alto valor.

En otra forma de realización preferente se puede modificar la atmósfera para incorporar CO₂ con el fin de aumentar la productividad en al menos un 20%. En esta realización el CO₂ será transferido a la atmósfera circundante a una concentración como máximo el 5%.

A5. Cosechado y procesamiento de la biomasa en consorcio (4):

En la forma de realización preferente el método de cosechado consiste en detener el paso del medio de cultivo sobre el sustrato fibroso polimérico y dejar entre 10 minutos y 1 hora de reposo para alcanzar la máxima deshidratación, del 80 al 90%. Entonces, se procede al arrastre de la biomasa de arriba hacia abajo con una herramienta de acero inoxidable: una espátula de borde liso y uniforme.

En la forma de realización preferente el método de procesado consiste en una pre-homogenización en un homogeneizador a 2000 RPM, con el fin de fragmentar al máximo las colonias de cianobacterias. Entonces, esta biomasa es sometida a un proceso de disrupción celular con la tecnología de homogenización en alta presión (HPH, siglas en inglés). Esta tecnología HPH es proceso puramente mecánico que somete un fluido a pasar a través de una ranura a alta presión. Se utilizó el equipo Emulsiflex C3 (Avestin, Inc., Canadá) con una capacidad de caudal de 3 L/h. Las condiciones de trabajo utilizadas son de 2000 bares de presión y en ciclo continuo, para obtener un tamaño de partícula en el producto final de entre 2 y 10 µm. La muestra fue diluida para bajar la concentración de la biomasa para lograr una condición óptima de trabajo. Finalmente, la biomasa obtenida es transferida a un congelador a -18°C y posteriormente sometida a un proceso de liofilización para que el producto final alcance un contenido de humedad menor al 5%.

B. Sistema de cultivo de consorcio *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias:

La forma de realización preferente (figuras 7 a 13) es la construcción del chasis (18) mediante un tubo cuadrado de acero inoxidable de 40x40 milímetros y 2 milímetros de espesor. Dicho chasis se apoya en 4 pies de soporte y nivelado (14) de chapa circular de acero inoxidable de 100 milímetros de diámetro y 10 milímetros de espesor. A cada uno de dichos pies se suelda una varilla roscada de acero inoxidable de métrica 10 en el centro del disco (14). En cada varilla se inserta una tuerca y su correspondiente arandela también de acero inoxidable (14). En cada uno de los 4 tubos cuadrados de acero inoxidable (en su parte inferior) se sueldan 4 tapas en cuyo centro se realiza un taladro de 11 milímetros que permite el paso de la varilla roscada. Mediante sistema de tuerca y arandela dicha varilla habilita la variación de la altura de cada pata lo que permite nivelar perfectamente el FACI.

A fin de ajustar perfectamente la tensión superficial del sustrato fibroso polimérico (23) se disponen 4 conjuntos tensores. Tanto las alas soporte tensoras (16 y 19) como los tensores (15 y 20) se construyen con el mismo tubo cuadrado del chasis. Dichas alas se sueldan al chasis. Se realizan taladros de 11 milímetros tanto en las alas como los tensores. Estos taladros permiten el paso de las varillas roscadas que, junto con las tuercas y arandelas (17), proporcionan un ajuste milimétrico del conjunto.

Los conjuntos de varilla roscada, tuercas y arandelas (17) son idénticos a los utilizados en los pies de apoyo.

En esta forma de realización preferente, el sustrato fibroso polimérico (23) es de polipropileno. Dicho sustrato polimérico se pliega sobre sí mismo en sus dos extremos y posteriormente se cose longitudinalmente. De este modo se genera un túnel que sirve para colgar el sustrato fibroso por medio de los tensores superior (20) e inferior (15).

Así mismo, sobre el tensor superior se monta el canal desbordante (22) consistente en un perfil en U de acero inoxidable de 40 milímetros de ancho y 20 de alto por 3 milímetros de espesor. En los extremos de este canal se sueldan dos pletinas en ángulo de 90° para cerrar el mismo. En cada una de estas pletinas (en su cara no soldada al canal desbordante) se realiza un taladro de 11 milímetros. Nuevamente, a través de dichos taladros mediante varilla roscada, tuercas y arandelas se fija el canal desbordante al tensor superior.

En esta forma de realización preferente, el medio de cultivo es contenido en una cuba de acero inoxidable (24) con una capacidad total de entre 10 y 150 litros. El acero inoxidable tiene un acabado superficial 2B. Para mejorar la limpieza de la cuba, una forma de realización aún más preferente es la utilización de un acero inoxidable con acabado 2R o BA.

Gracias a la bomba sumergida (27) el medio de cultivo es bombeado a través de la tubería de PVC de 16 milímetros (28) hasta inundar de manera homogénea el canal desbordante gracias a las 4 salidas dispuestas en el mismo.

Como se ha mencionado, el control del caudal de medio de cultivo es de suma importancia.

- 5 Para garantizar dicha regulación, se dispone una válvula de ajuste de caudal de PVC (29) y un caudalímetro (20).

C. Biomasa de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm:

10 La forma de realización preferente de la biomasa de consorcios *ad-hoc* está compuesta por las microalgas marinas verdes *Nannochloropsis gaditana* y *Tetraselmis chunii* y la cianobacteria *Oscillatoria sp*, denominada Marine Algaemass (11) (figura 4). Marine Algaemass alcanza un alto rendimiento en producción (1,6 gr de materia seca/m²/día) cuando el consorcio de especies alcanza un estado de equilibrio en la densidad de celular(12) (figura 5)., a los 30 días aproximadamente. Este estado, que hemos denominado “equilibrio de quórum” se alcanza
15 durante el ciclo de cultivo

La biomasa de la forma de realización preferente contiene en fracción de peso seco entre 60,9 y un 35,7 % de proteína total; 45,7 y 0,7% de lípidos totales; 30,5 y 12,4% de hidratos de carbono; 10,15 y 5,14% de sales y 20,50 y 17,4 % de fibra alimentaria (31) (Figura 14).

20 En la fracción proteica se identificaron 4 tipos de aminoácidos de gran interés por su elevada concentración (32) (Figura 16). Entre los aminoácidos esenciales destaca el elevado contenido en Leucina (9 %). Este aminoácido tiene funciones especiales en la cosmética como ingrediente de fragancia, agente acondicionador del cabello y acondicionador de la piel. Entre los no esenciales destaca el elevado contenido en ácido aspartánico y glutámico (13,2%).
25 Estos aminoácidos tienen funciones especiales en la cosmética para la elaboración de cremas revitalizantes para la piel.

El cromatograma de ácidos grasos (33) (Figura 16) reveló un elevado contenido de ácido palmítico (43,95%) y ácido linolénico (17,08%). Este perfil es especialmente abundante en las especies de cianobacterias. El ácido palmítico es utilizado en cosmética como ingrediente de fragancia, agente de opacidad, surfactante, agente limpiante, emulsificante y emoliente. Este
30 ácido está considerado en el ranking como uno que tiene más utilidad en cosmética, según EWG cosmetic database.

Se realizó la extracción de vitaminas por el método de HPLC y LC-MS/MS. El contenido de vitaminas es variable (34) (Figura 17), sin embargo; destacan por su elevado contenido en vitamina E (71 mg/kg) y C (69 mg/kg), que representaron en conjunto el 88,5% del total de vitaminas.

- 5 El contenido en pigmentos de la biomasa Marine Algaemass (35) (Figura 18) fue extraído por el método HPLC. Los principales pigmentos encontrados fueron la clorofila A (180 mg/kg) y el beta-caroteno (79,52 mg/kg), sin embargo; en su composición también destacan T- luteína (33,09 mg/kg), cantaxantina (11,79 mg/kg) y clorofila C (25,30 mg/kg).

- 10 Tras un estudio de la composición de polifenoles, los principales compuestos encontrados fueron: 4-hidroxibenzaldehído y ácido p-cumárico, entre otros. Se cuantificó la composición de fenoles totales que fue de $67,765 \pm 11,575$ mg/mL equivalente de ácido gálico (EAG). Se realizaron pruebas de capacidad de captura de radicales DPPH cuyo resultado fue de $80,01 \pm 7,57$ equivalente de ácido ascórbico (EAA).

- 15 Probablemente la acción conjunta de estos compuestos, sumado a la presencia de los pigmentos y las vitaminas estén relacionados con la alta capacidad antioxidante de Marine Algaemass.

Se han identificado aplicaciones industriales de la biomasa de consorcio *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm de la forma de realización preferente (Marine Algaemass). La principal aplicación es para el campo de la industria cosmética y de la dermatología clínica.

- 20 A partir de un estudio *in-vitro* se evaluó la eficacia cosmética de Marine Algaemass mediante un screening enzimático y no enzimático sobre diversas acciones.

Se evaluó el potencial de capacidad des-pigmentante / protección natural UV, basada en la actividad de la enzima tirosinasa. También se evaluó el potencial reafirmante / antiarrugas basado en la inhibición de las actividades de las enzimas elastasa, hialuronidasa y colagenasa.

- 25 Finalmente se evaluó la capacidad antienvjecimiento basado en la inhibición de las actividades de glicosilación, oxidación general y de peroxidación lipídica.

- 30 Para la ejecución de los ensayos enzimáticos y los ensayos no enzimáticos la muestra se analizó a una concentración del 0,3%. La cuantificación de los productos finales de la reacción enzimática y no enzimática se realizó mediante espectrofotometría o fluorimetría, respecto a controles positivo y negativo.

El extracto de Marine Algaemass al 0,3% fue efectivo para inhibir la actividad de la enzima tirosinasa en un 51,48% respecto al control negativo de inhibición (CNI) (36) (Figura 19). El

extracto también fue efectivo en la inhibición de la actividad de la enzima hialuronidasa en un 50,08% (37) (Figura 19).

Marine Algaemass al 0,3% presentó una actividad antiglicosilación del 34,23% (38) (Figura 19) y una capacidad antioxidante a 58,33 μ M en equivalente TROLOX (39) (Figura 19).

5 Estos resultados indican que Marine Algaemass muestra efectos positivos frente a diversos procesos de interés en cosmética:

- Por una parte, actúa como regenerador celular.
- Aporta luminosidad a la piel debido a la capacidad de inhibición de la enzima tirosinasa del 51,48%.

10 - Tiene actividad reafirmante / antiarrugas ya que protege frente a la degradación del ácido hialurónico, debido a la capacidad de inhibir la enzima hialuronidasa en un 50.08%

- Protege frente al envejecimiento prematuro, foto-envejecimiento y efectos de la contaminación gracias a su actividad protectora frente a la glicosilación y por los resultados de equivalente TROLOX.

15 Otras aplicaciones industriales posible de esta biomasa son:

- Acuicultura: formulación para alimentación de zooplancton y peces herbívoros;
- Pesca deportiva: formulación para elaborar cebo de pesca, con propiedades de atracción especialmente en carpfishing;

20

REIVINDICACIONES

1. Un método o procedimiento para el cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
 - 5 a) La elaboración del medio de cultivo (1);
 - b) La incubación de cepas puras (2);
 - c) La incubación de cultivo de arranque (3);
 - d) El cultivo de consorcios de especies en Foto-fermentadores Abiertos de células inmovilizadas (FACI) (4);
 - 10 e) El cosechado y procesado de la biomasa (5 y 6);
2. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque el medio de cultivo contiene una formulación básica y una formulación nutritiva para realizar los cultivos de cepas puras, cultivos de arranque o cultivos en FACI.
3. Un método, según la reivindicación 2, con una formulación básica que contiene una
 - 15 mezcla de sales, en proporción variable, según las especies a cultivar, como sigue:
 - a. Para agua dulce: CaCO_3 (40 a 30%), NaHCO_3 (20 a 10%), Mg SO_4 (10 a 5%), NaCl (5 a 3%), KCl (5 a 2%) y otras sales de carbonato y sulfato.
 - b. Para agua dura: CaCO_3 (60 a 50%), NaHCO_3 (40 a 30%), Mg SO_4 (20 a 10%), NaCl (5 a 3%), y KCl (5 a 2%) y otras sales de carbonato.
 - 20 c. Para agua marina: NaCl (60 a 80%); $\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (6 a 8%); Mg Cl_2 (4 a 6%); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 a 3%); KCl (0,5 a 1%) y NaHCO_3 (0,5 a 1%) y otras sales de cloruro y sulfato.
4. Un método, según la reivindicación 2, con una formulación nutritiva que contiene una
 - 25 fórmula modificada de medio nutritivo de sales, a partir de los medios nutritivos convencionales para microalgas y cianobacterias, en proporción variable según las especies a cultivar:
 - a. Para agua dulce y de aguas duras: Medio de Rodríguez – López, medio Bold Basal, medio nutritivo para cianobacterias ASN-III + solución traza A5+Co y la mezcla de otros medios nutritivos.
 - 30 b. Para agua de mar: Medio de Miguel, medio Guillard F $\frac{1}{2}$, ASN-III + solución traza A5+Co y la mezcla de otros medios nutritivos.
5. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque las condiciones fisicoquímicas de incubación de cepas puras (7) comprenden:

- a. Con medio de cultivo de agua dulce: 5 a 10 mS/cm de conductividad eléctrica, 0 a 5 ppm de salinidad, 6,5 a 7 unidades de pH, 18°C de temperatura, 16:8 horas de fotoperíodo (luz: oscuridad) y una irradiancia entre 300 y 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$.
- b. Con medio de cultivo de agua de mar: 5.000 a 6.000 mS/cm de conductividad eléctrica, 35 a 50 ppm de salinidad, 7,5 a 8,5 unidades de pH, 18°C de temperatura, 16:8 horas de fotoperíodo (luz: oscuridad) y una irradiancia entre 300 y 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$.
- c. Con medio de cultivo de aguas duras: > 6.000 mS/cm de conductividad eléctrica, 9 a 11 unidades de pH, 25 a 30°C de temperatura, 16:8 horas de fotoperíodo (luz: oscuridad) y una irradiancia entre 300 y 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$.
6. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque las condiciones fisicoquímicas de incubación de los cultivos de arranque (8) comprenden:
- a. Con medio de cultivo de agua dulce: 5 a 10 mS/cm de conductividad eléctrica, 0 a 5 ppm de salinidad, 6,5 a 7 unidades de pH, 22 a 26°C de temperatura, 16:8 horas de fotoperíodo (luz: oscuridad) y una irradiancia entre 1.000 a 2.000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$.
- b. Con medio de cultivo de agua de mar: 5.000 a 6.000 mS/cm de conductividad eléctrica, 35 a 50 ppm de salinidad, 7,5 a 8,5 unidades de pH, 22 a 24°C de temperatura, 16:8 horas de fotoperíodo (luz: oscuridad) y una irradiancia entre 1.000 a 2.000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$.
- c. Con medio de cultivo de aguas duras: > 6.000 mS/cm de conductividad eléctrica, 9 a 11 unidades de pH, 25 a 30°C de temperatura, 16:8 horas de fotoperíodo (luz: oscuridad) y una irradiancia entre 1.000 a 2.000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$.
7. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa de cultivo de consorcios *ad-hoc* de especies en Foto-fermentadores Abiertos de Células Inmovilizadas (FACI) (4) comprende 3 etapas:
- a. La etapa de hidratación del sustrato fibroso polimérico, que consiste en incorporar un volumen de entre 30 y 200 lts de la formulación básica y añadir las sales de la formulación nutritiva en el depósito para que el panel, conformado por el sustrato fibroso polimérico se hidrate, durante al menos 48 horas.
- b. la etapa de mezcla de cultivos de arranque que consiste en incorporar al menos 3 litros de cultivo de una especie de cianobacteria y, transcurridas al menos 48 horas, incorporar al menos 3 litros de cultivo de una especie de microalga, ambos, en la cuba para medio de cultivo del FACI.

- c. La alimentación y mantenimiento de cultivos en FACL que consiste en incorporar las sales de la formulación nutritiva al menos 2 veces por semana y realizar la limpieza del FACL al menos 1 vez por semana.
- 5 8. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque las condiciones fisicoquímicas de incubación de los cultivos en FACL (9) comprenden:
- a. Con medio de cultivo de agua dulce: 5 a 10 mS/cm de conductividad eléctrica, 0 a 5 ppm de salinidad, 6,5 a 7 unidades de pH, 22 a 26°C de temperatura, desde 0:24 a 24:0 horas de fotoperíodo (luz: oscuridad) y una irradiancia entre 0 a 3.000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$.
- 10 b. Con medio de cultivo de agua de mar: 5.000 a 6.000 mS/cm de conductividad eléctrica, 35 a 50 ppm de salinidad, 8,5 a 9,5 unidades de pH, 22 a 24°C de temperatura, desde 0:24 a 24:0 horas de fotoperíodo (luz: oscuridad) y una irradiancia entre 0 a 3.000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$.
- 15 c. Con medio de cultivo de aguas duras: > 6.000 mS/cm de conductividad eléctrica, 9 a 11 unidades de pH, 25 a 30°C de temperatura, desde 0:24 a 24:0 horas de fotoperíodo (luz: oscuridad) y una irradiancia entre 0 a 3.000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$.
9. Un método, según las reivindicaciones 7 y 8, en donde, transcurridos al menos 30 días, la tasa de productividad de biomasa de consorcio de microalgas y cianobacterias comprende una ratio entre 1,48 y 4 gr de materia seca/ $\text{m}^2/\text{día}$, según las especies que intervengan en el consorcio.
- 20 10. Un método, según la reivindicación 2 y 4, que comprende un aumento de la proporción en el contenido en solución de nitratos en relación 4:1 respecto al resto de los medios nutritivos para promover un incremento en el contenido en proteínas de la biomasa de consorcios.
- 25 11. Un método, según la reivindicación 2, 4 y 8, que comprende el suministro de cualquier fuente de carbono orgánico (por ejemplo: glucosa o glicerol) y la ausencia de luz, en relación 1:1 con la solución de nitratos, para promover un incremento en el contenido en lípidos totales y lípidos de alto valor de la biomasa de consorcios.
- 30 12. Un método, según la reivindicación 8, que comprende el uso de iluminación artificial LED, combinando longitud de onda roja (660 nm) y azul (420 a 470 nm) en atmósfera controlada, para promover un incremento en la productividad de la biomasa de consorcios, en al menos un 15%.
- 35 13. Un método, según la reivindicación 9, que comprende el uso de una fuente artificial de CO_2 , en una concentración del 5% en atmósfera controlada para promover un

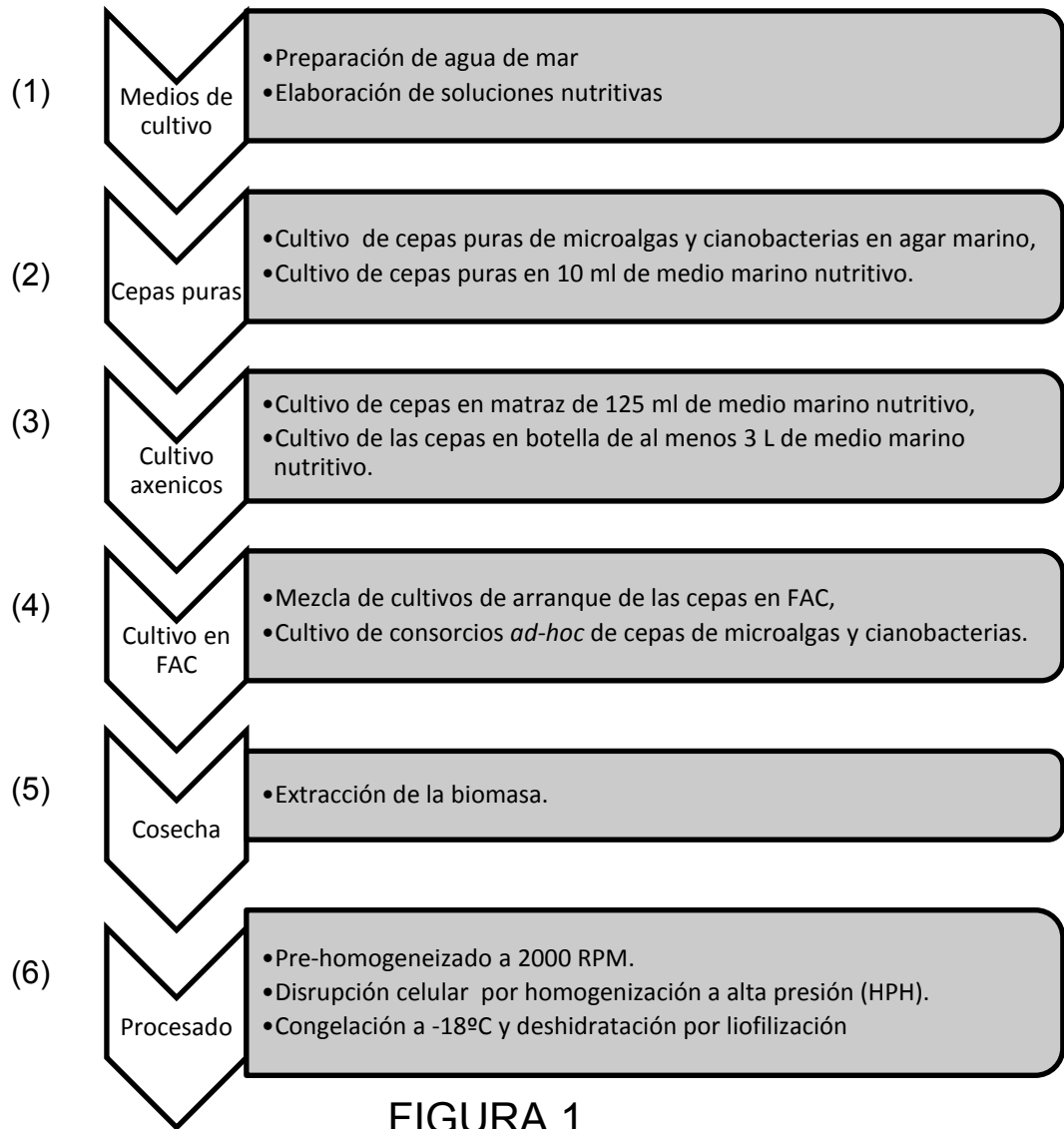
incremento la productividad del consorcio de microalgas y cianobacterias, al menos un 20%.

14. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado por un cosechado (5) y un procesado (6), al menos 1 vez por semana, que comprende las siguientes etapas:
- 5 a. Detener el paso del medio de cultivo sobre el sustrato fibroso polimérico hasta alcanzar una deshidratación del 80 al 90%.
- b. Realizar el arrastre de la biomasa de arriba hacia abajo con una herramienta de acero inoxidable, de borde liso y uniforme.
- c. Pre-homogenizar la biomasa en un homogeneizador de al menos 200 RPM.
- 10 d. Disrupción celular y homogenizar la biomasa, pre-hidratada con agua destilada hasta 97,5% de humedad, utilizando la tecnología de Homogeneización a alta presión (HPH, siglas en inglés), que comprende un caudal de 3 L/h y 2.000 bares de presión en ciclo continuo hasta obtener un producto final con tamaño de partícula de 2 a 10 μm .
- 15 e. Almacenar la biomasa obtenida en congelador a -18°C .
- f. Liofilizar la biomasa congelada hasta alcanzar un máximo de 5% de humedad.
15. Un sistema de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm (13), caracterizado porque comprende un Foto-fermentador Abierto de Células Inmovilizadas (FACI) y un mecanismo de bombeo del medio de cultivo:
- 20 a. Un chasis de soporte (18) al que se sueldan las alas soporte para tensor inferior y superior (16 y 17) sobre las que se montan los tensores: inferior (15) y superior (20),
- b. un sustrato fibroso polimérico (23) soportado por los tensores inferior (15) y superior (20), por el que fluye en sentido descendente un medio líquido de cultivo que contiene un consorcio de microalgas y cianobacterias bombeado desde una cuba para medio de cultivo (24) a la que vuelve a caer dicho medio de cultivo y en la que el sustrato fibroso polimérico (23) se encuentra parcialmente sumergido,
- 25 c. cuatro pies de soporte y nivelado (14), uno en cada una de las 4 extremidades del chasis de soporte (18).
- 30 d. un canal desbordante (22) de medio de cultivo en su parte superior, que permite un reparto homogéneo de dicho medio de cultivo, por el principio de lámina desbordante al sustrato fibroso polimérico (23).
- e. un tensor inferior (15) y otro superior (20) para ajustar la altura y tensión del sustrato fibroso polimérico (23). Estos tensores (15 y 20) permiten mediante sus
- 35

- correspondientes varillas roscadas, tuercas y arandelas un ajuste perfecto de la tensión a la que se somete el sustrato fibroso polimérico (23). Así mismo, permiten sumergir parcialmente hasta una altura variable el sustrato fibroso polimérico (23) en el medio de cultivo (25) contenido en la cuba para medio de cultivo (24).
- 5
- f. una bomba sumergida (27) encargada de trasegar el medio de cultivo desde la cuba para medio de cultivo (24) al canal desbordante (22) mediante una tubería (28) en la que hay intercalados un caudalímetro (30) y una válvula de ajuste de caudal (29),
- 10
- g. una válvula de ajuste de caudal (29) y un caudalímetro (30) para la regulación del caudal de medio de cultivo que fluye desde la cuba para medio de cultivo (12) hasta el canal desbordante (22).
16. Un sistema de cultivo, según la reivindicación 15, caracterizado porque están integradas al menos dos unidades de sistema de cultivo.
- 15
17. Un sistema de cultivo, según la reivindicación 15, utilizando otro tipo de fotobiorreactores distintos al FACI, tales como: fotobiorreactores abiertos: lagunas, estanques y raceway; o fotobiorreactores cerrados: bolsas, cilindros tubulares, paneles planos de plástico o metacrilato, en vertical y/o horizontal y airlift, todos estos, con las variantes posibles que cada uno de ellos.
- 20
18. Una biomasa de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm, caracterizada porque comprende al menos una especie de microalga (de los grupos taxonómicos: Chlorophyta, Rhodophyta, Glaucophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Heterokontophyta, Haptophyta, Cryptophyta y Chlorarachniophyta) y una especie de cianobacteria (de los grupos taxonómicos Cyanophyta y Prochlorales) y, además, otros grupos de microorganismos (otras bacterias, mohos y levaduras) que se encuentran en menor proporción, en torno al < 5% de la biomasa.
- 25
- La composición de los consorcios *ad-hoc* pueden comprender las siguientes combinaciones de especies:
- 30
- a. Las microalgas marinas verdes *Nannochloropsis gaditana* y *Tetraselmis chuii* y la cianobacteria *Oscillatoria sp*, denominada Marine Algaemass (12).
- b. microalgas marinas diatomeas *Navicula sp*, *Pinnularia sp* y la cianobacteria *Oscillatoria sp*;
- c. microalgas marinas diatomeas y flageladas: *Skeletonema costatum*,
- 35
- Monochrysis luteri* e *Isochrysis galbana* y la cianobacteria *Lyngbya sp*;

- d. microalgas de agua dulce: *Ullothrix sp*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus sp* y la cianobacteria de agua dulce *Pseudolyngbya sp*;
- e. microalgas de agua alcalina extremófila (en medio de cultivo con pH superior a 10): *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp*; y la cianobacteria. *Arthrospira platensis*;
- f. microalgas marinas en medio de cultivo con salinidad > 90 ppm: *Dunaliella salina*, *Nannochloropsis gaditana*, *Phaeodactylum tricornutum* y la cianobacteria: *Halospirulina sp*;
- g. Otros consorcios de microalgas y cianobacterias.
19. Una biomasa de consorcio, según reivindicación 18, caracterizada porque la composición bioquímica del tipo de consorcio Marine Algaemass comprende:
- a. Una composición proximal (31) de entre 60,9 y un 35,7 % de proteína total; 45,7 y 0,7% de lípidos totales; 30,5 y 12,4% de hidratos de carbono; 10,15 y 5,14% de sales y 20,50 y 17,4 % de fibra alimentaria.
- b. Una fracción proteica con al menos 4 tipos de aminoácidos (32), siendo la leucina al menos 9% y los ácidos aspartánico y glutámico de al menos el 13,2%.
- c. Una fracción lipídica (33) con al menos el 43,95% de ácido graso palmítico con y al menos 17,08% de ácido graso linolénico.
- d. Una composición de vitaminas (34). Con al menos entre 0 y 150 mg /kg de vitamina A y/o C y/o E, en proporción variable, constituyendo en conjunto al menos el 80% del total de vitaminas.
- e. Un contenido en pigmentos totales (35) de entre 250 y 400 mg/ kg con al menos clorofila A, B, C, betacaroteno, T-luteína, cantaxantina y filicoproteínas.
- f. Un contenido en polifenoles con al menos entre 5 y 100 mg /ml equivalente de ácido gálico y que comprende al menos una parte de ácido paracumárico y una parte de 4-hidroxibenzaldehído, en proporción variable.
20. Una biomasa de consorcio, según reivindicación 18, caracterizada porque las aplicaciones industriales del consorcio Marine Algaemass comprenden: cosmética, alimentación animal, alimentación humana, acuicultura, farmacéutica, la industria química, la industria de la energía y la industria de los materiales.
21. Una biomasa de consorcio, según reivindicación 18, caracterizada porque los usos cosméticos del consorcio Marine Algaemass comprenden:
- a. Producto para la regeneración celular, porque incrementa el crecimiento de los queratinocitos a una concentración del al menos 0,03%.

- b. Aplicación en productos blanqueantes, porque aporta luminosidad a la piel debido a la capacidad de inhibición de la enzima tirosinasa al menos en un 51,48% (36).
- 5 c. Aplicación en productos reafirmantes y antiarrugas, ya que protege frente a la degradación del ácido hialurónico, debido a la capacidad de inhibir la enzima hialuronidasa en un 50,08% (37).
- 10 d. Aplicación en productos para contrarrestar el envejecimiento prematuro, foto-envejecimiento y los efectos de la contaminación gracias a su actividad protectora frente a la glicosilación de al menos el 34,23% (38) y frente a la oxidación en equivalentes TROLOX (39).



	Etapas de cultivo	Parámetros óptimos	Unidades	Agua dulce	Agua de mar	Agua dura
(7)	A2. Cepas puras	Conductividad	mS/cm	5 a 10	5.000 a 6.000	> 6.000
		Salinidad	ppm	0 a 5	35 a 50	
		pH	U. pH	6,5 a 7	7,5 a 8,5	9 a 11
		Temperatura	°C	18	18	25 a 30
		Fotoperíodo (luz:oscuridad)	(horas)		16:8	
		Iluminación	μmol/m ² /seg		300 a 500	
(8)	A3. Cultivos de arranque	Conductividad	mS/cm	5 a 10	5.000 a 6.000	> 6.000
		Salinidad	ppm	0 a 5	35 a 50	
		pH	U. pH	6,5 a 7	7,5 a 8,5	9 a 11
		Temperatura	°C	22 a 26	22 a 24	25 a 30
		Iluminación	μmol/m ² /seg		1.000 a 2.000	
		Fotoperíodo (luz:oscuridad)	(horas)		16:8	
(9)	A4. FACI	Conductividad	mS/cm	5 a 10	5.000 a 6.000	> 6.000
		Salinidad	ppm	0 a 5	35 a 50	
		pH	U. pH	6,5 a 7	8,5 a 9,5	9 a 11
		Temperatura	°C	22 a 26	22 a 24	25 a 30
		Iluminación	μmol/m ² /seg		0 a 3.000	
		Fotoperíodo (luz:oscuridad)	(horas)		0:24 a 24:0	

FIGURA 2

(10)

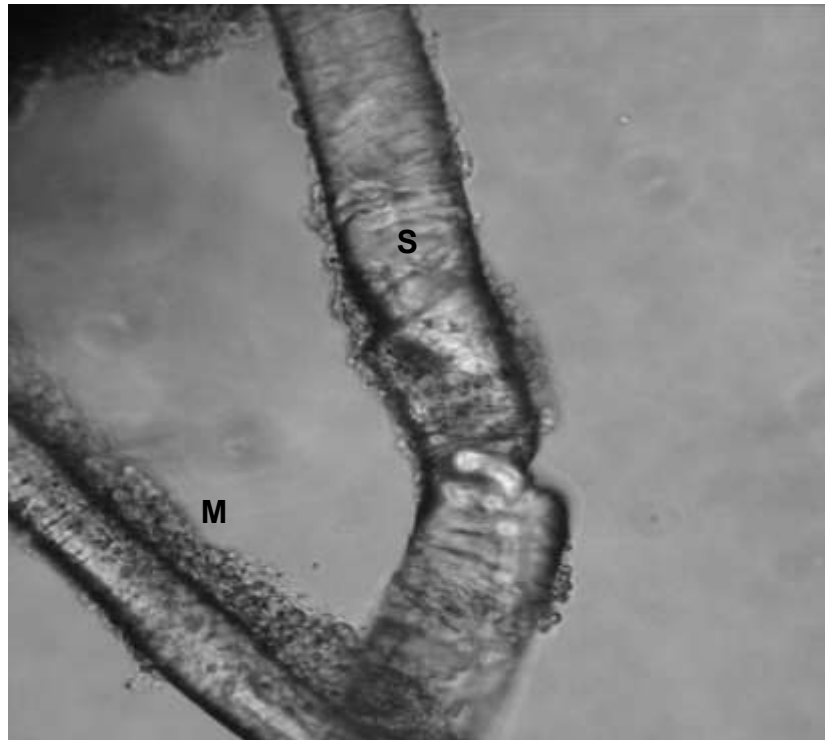


FIGURA 3

(11)

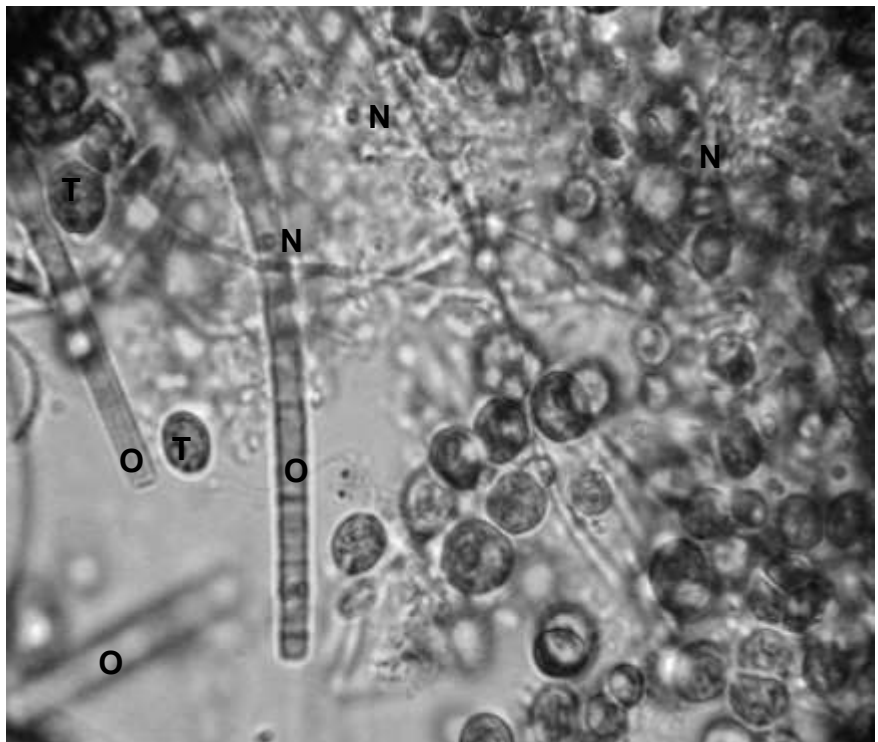


FIGURA 4

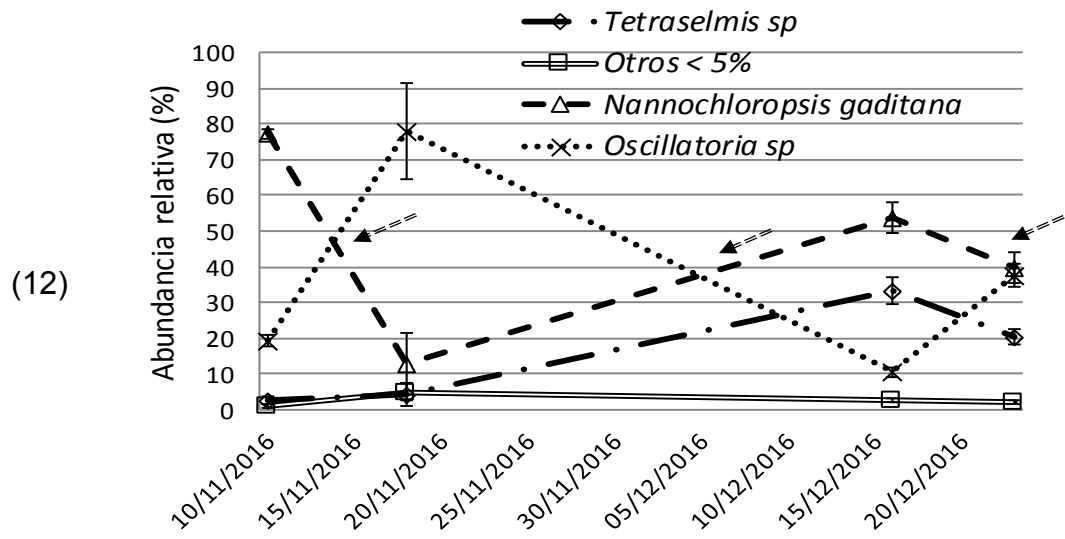


FIGURA 5

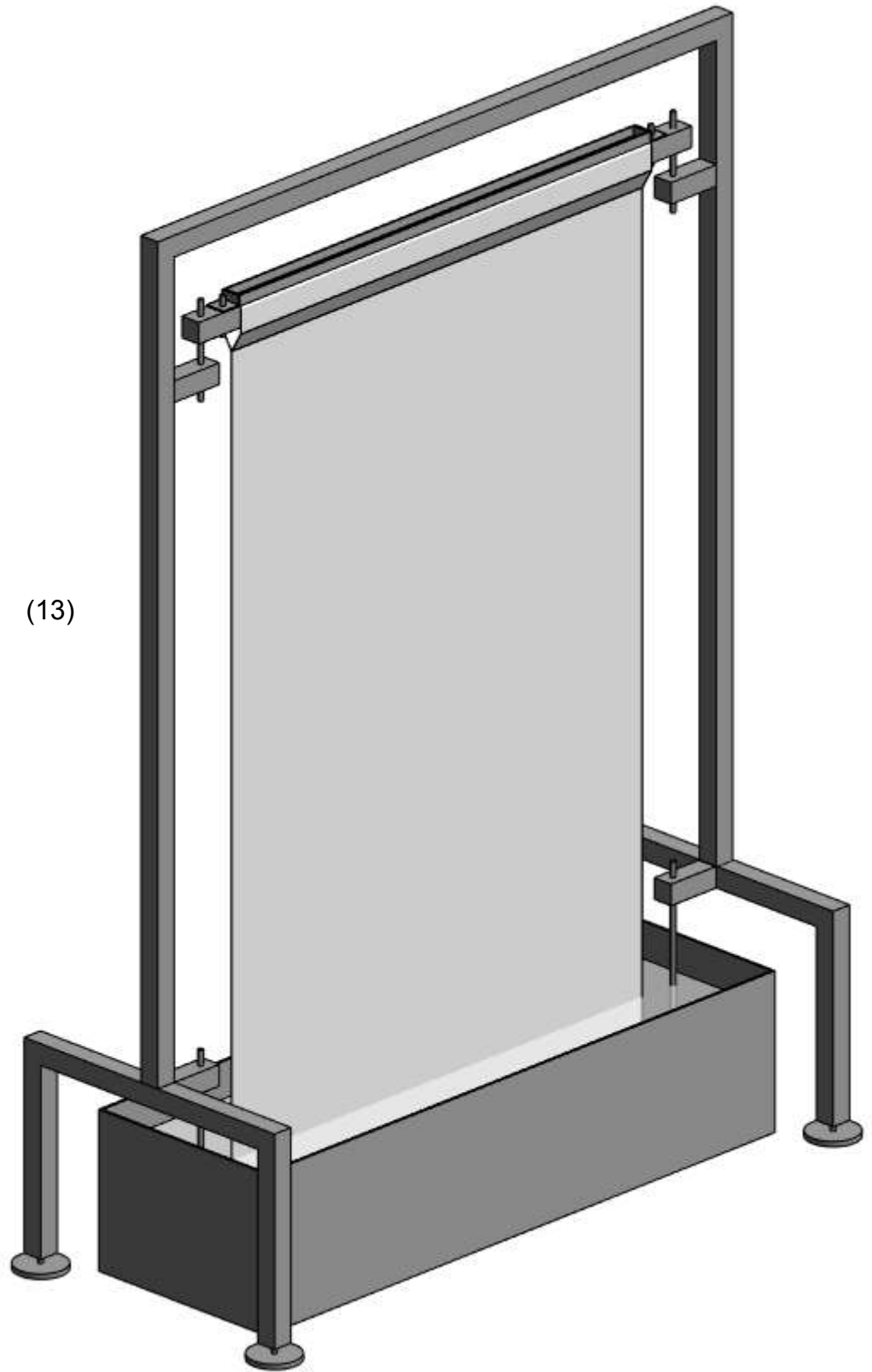


FIGURA 6

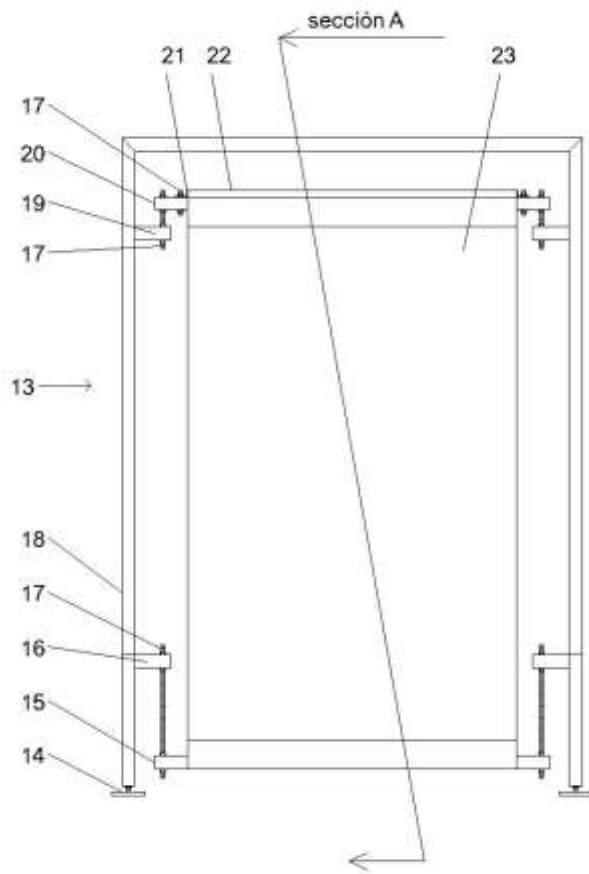


FIGURA 7

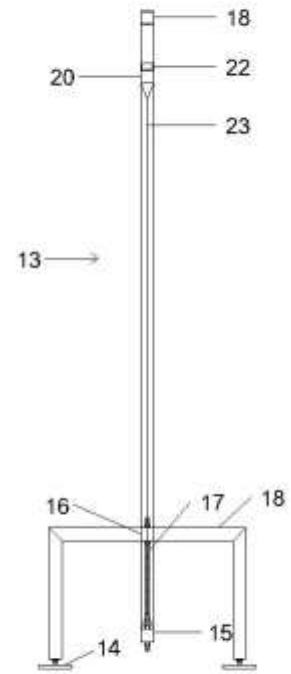


FIGURA 8

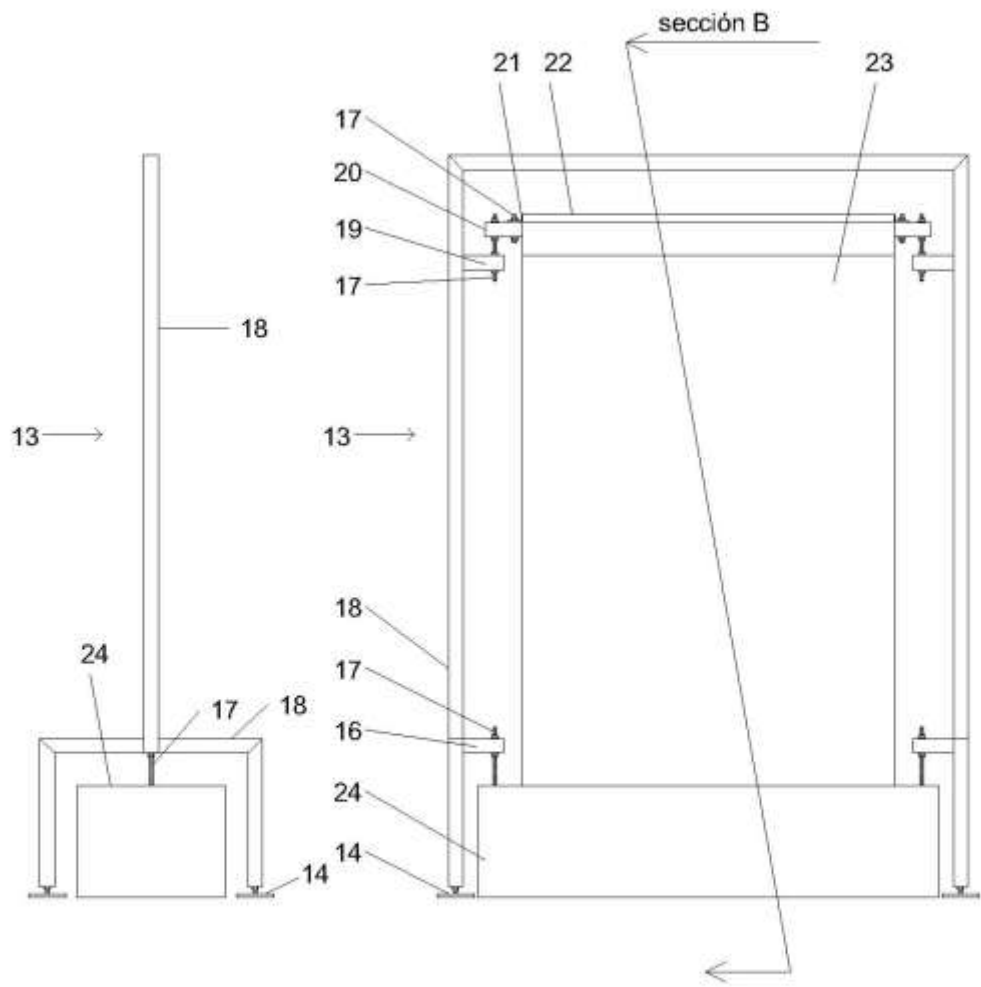


FIGURA 9

FIGURA 10

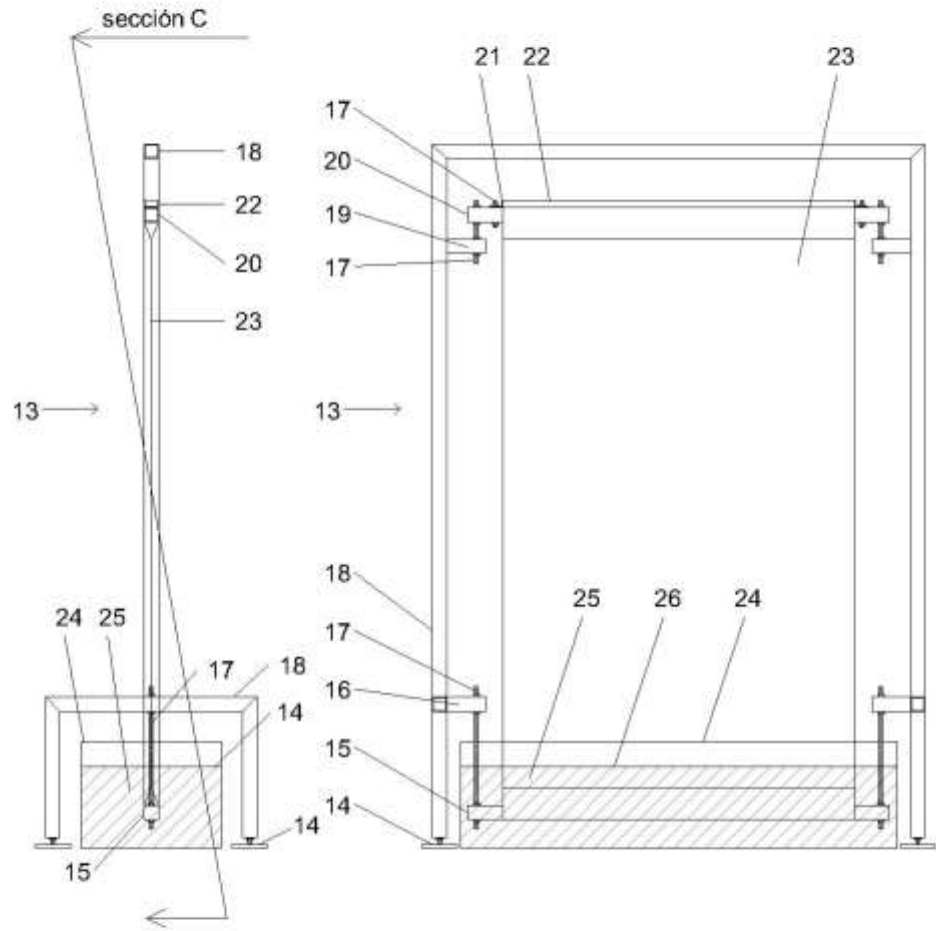


FIGURA 11

FIGURA 12

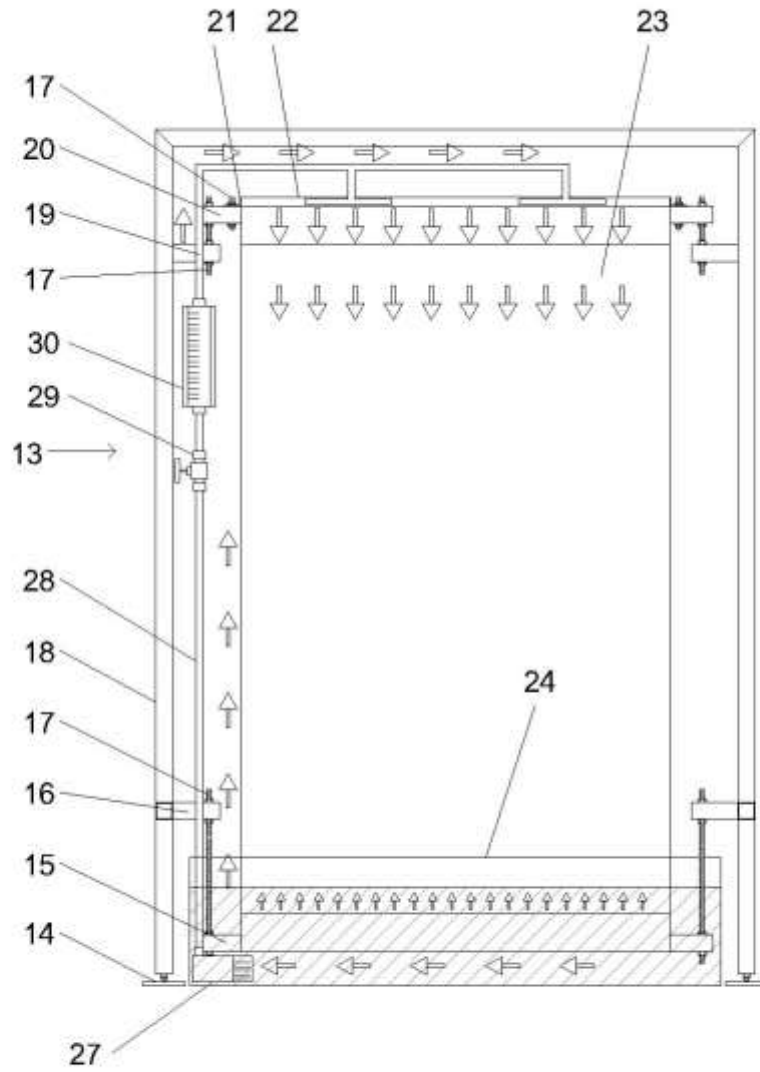


FIGURA 13

(31)

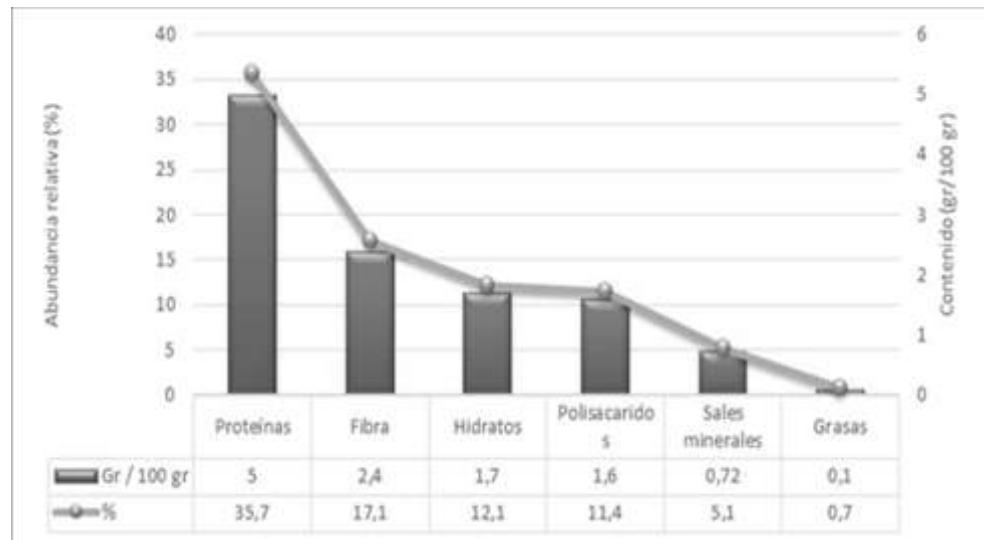


FIGURA 14

(32)

Aminograma	Cantidad (gr / 100 gr)	% en el total de proteínas
Esenciales		
His	0,06	1,2
Thr	0,28	5,6
Lys	0,23	4,6
Met	0,07	1,4
Val	0,32	6,4
Ile	0,28	5,6
Leu	0,45	9
Phe	0,26	5,2
No esenciales		
Ser	0,25	5
Arg	0,31	6,2
Gly	0,28	5,6
Asp	0,61	12,2
Glu	0,66	13,2
Ala	0,42	8,4
Pro	0,23	4,6
Cys	0,05	1
Tyr	0,23	4,6

FIGURA 15

(33)

Ácido graso			% total de grasas
C (14:0)	Acido	Mirístico	0,86
C (14:1)	Acido	Miristoléico	0,2
C (15:0)	Acido	Pentadecanóico	0,76
C (16:0)	Acido	Palmítico	43,95
C (16:1)	Acido	Palmitoleico	5,95
C (17:0)	Acido	Margárico	1,07
C (17:1)	Acido	Margaroléico	0,5
C (18:0)	Acido	Estearíco	2,447
C (18:1)	Acido	Oleico	17,08
C (18:2)	(w6)	Ácido linoléico	15,35
C (18:3)	(w3)	Acido alfa-linolénico	4,87
C (18:4)	(w3)	Ácido Estearidónico	3,98
C (20:0)	Acido	Araquídico	0,33
C (20:2)	Acido	Eicosadienóico	0,92
C (20:4)	(w6)	Acido Araquidónico (EPA)	0,48
C (20:5)	(w3)	Ácido Eicosapentaenóico	0,46
C (22:5)	(w6)	Ácido Osmond	0,24
C (22:6)	(w3)	Ácido Docosohexaenóico (DHA)	0,55

FIGURA 16

(34)

Determinaciones:	Método	mg /kg	Cantidad relativa (%)
Vitamina A	HPLC	4,9	3,10
Vitamina E	HPLC	71	44,89
Vitamina B1	LC-MS/MS	0,9	0,57
Vitamina B2	LC-MS/MS	1,86	1,18
Nicotinamida-Vitamina B3	LC-MS/MS	3,5	2,21
Vitamina B5	LC-MS/MS	7	4,43
Vitamina C	HPLC	69	43,63

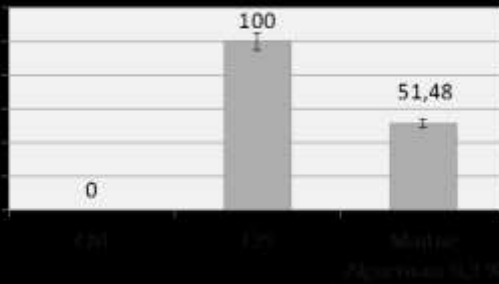
FIGURA 17

(35)

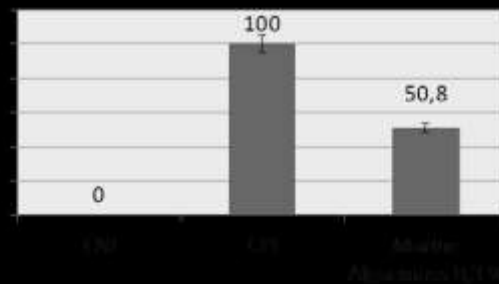
Tipo de pigmento	Unidades	Valor
Pigmentos carotenoides	mg/Kg	142
Beta-caroteno	%	56
t-Luteína	%	23,3
Cantaxantina	%	8,3
t-Zeaxantina	%	5,5
Xantofilas amarillas No identificadas	%	4,3
Alfa, Beta-Criptoxantina	%	2,7
Otros	%	<0,1
Clorofilas totales	mg/kg	222,6
Clorofila A	mg/kg	180
Clorofila B	mg/kg	17,3
Clorofila C	mg/kg	25,3

FIGURA 18

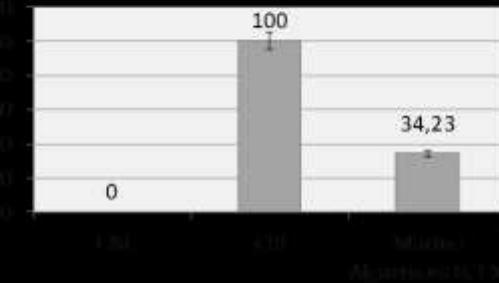
(36)



(37)



(38)



(39)

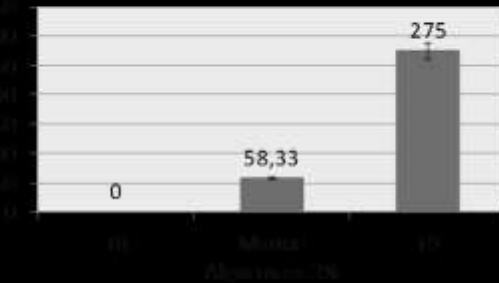


FIGURA 19



- ②① N.º solicitud: 201731448
②② Fecha de presentación de la solicitud: 21.12.2017
②③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ASHA PARMAR et al. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. Bioresource Technology, 05/08/2011, Vol. 102, N° 22, Páginas 10163 - 10172, <DOI: doi:10.1016/j.biortech.2011.08.030>. 3. Cultivation and down-stream processing of cyanobacteria and microalgae, 4.5 Co-products, figura 2.	1-14, 18-21
X	WO2011/138477A1 (UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID) 10/11/2011, Páginas 4-9, reivindicaciones 1-8, figuras 4-6.	15-17
X	THOMAS NAUMANN et al. Growing microalgae as aquaculture feeds on twin-layers: a novel solid-state photobioreactor. JOURNAL OF APPLIED PHYCOLOGY, 01/10/2013, Vol. 25, N° 5, Páginas 1413 - 1420, <DOI: doi: 10.1007/s10811-012-9962-6>. Materials and methods, figura 1.	15-17
X	SILABAN A et al. Effect of organic carbon, C: N ratio and light on the growth and lipid productivity of microalgae/cyanobacteria coculture. Engineering in Life Sciences, 31/12/2013, Vol. 14, N° 1, Páginas 47 - 56, <DOI: doi:10.1002/elsc.201200219>. 1. Introduction, 2.1 Microalgal species, Practical application.	18-21
X	ANGELIS S et al. Co-Culture of Microalgae, Cyanobacteria, and Macromycetes for Exopolysaccharides Production: Process Preliminary Optimization and Partial Characterization. Applied Biochemistry and Biotechnology, 14/03/2012, Vol. 167, N° 5, Páginas 1092 - 1106, <DOI: doi: 10.1007/s12010-012-9642-7>. Materials and Methods.	18-21
A	CN 104328032 A (STATE DEVELOPMENT & INVESTMENT CORP et al.) 04/02/2015, Resumen [en línea] recuperado de EPODOC/EPO y WPI/DERWENT, reivindicación 1, Figuras 1-3.	1-21
A	POSADAS E. et al. Enclosed tubular and open algal-bacterial biofilm photobioreactors for carbon and nutrient removal from domestic wastewater. Ecological Engineering, 04/05/2014, Vol. 67, Páginas 156 - 164, <DOI: doi:10.1016/j.ecoleng.2014.03.007>. Materials and methods, figura 1.	1-21

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<p>Fecha de realización del informe 12.06.2018</p>	<p>Examinador M. González Rodríguez</p>	<p>Página 1/3</p>
---	--	------------------------------



21 N.º solicitud: 201731448

22 Fecha de presentación de la solicitud: 21.12.2017

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES 2622628T T3 (ALGAECYTES LTD) 06/07/2017, Página 3, línea 11-página 4, línea 26.	1-21
A	MOURELLE, M. L et al. The Potential Use of Marine Microalgae and Cyanobacteria in Cosmetics and Thalassotherapy. Cosmetics, 01/11/2017, Vol. 4, Nº 46, Páginas 1-14. 3. Uses of microalgae and cyanobacteria for cosmetic applications, 4. The application of marine microalgae in thalassotherapy.	1-21
A	PADMAPERUMA G et al. Microbial consortia: a critical look at microalgae co-cultures for enhanced biomanufacturing. Critical Reviews in Biotechnology, 12/12/2017, Vol. 38, Nº 5, Páginas 690 - 703, <DOI: doi:10.1080/07388551.2017.1390728>. Co-culture design, Case study: microalgae co-cultures for biotechnological application.	1-21
A	GARCÍA-CUADRA, F., et al. . Valorización de biomasa de microalgas: Aprovechamiento de proteínas, carbohidratos y lípidos. . Rev. Latinoam. Biotecnol. Amb. Algal, , 2012, Vol. 3, Páginas 147-161. 1. Introducción.	1-21
A	SAN PEDRO A et al. Marine microalgae selection and culture conditions optimization for biodiesel production. Bioresource Technology, 01/04/2013, Vol. 134, Páginas 353 - 361, <DOI: doi:10.1016/j.biortech.2013.02.032>. Methods.	1-21
A	MATOS ANGELO PAGGI et al. Biomass, lipid productivities and fatty acids composition of marine <i>Nannochloropsis gaditana</i> cultured in desalination concentrate. Bioresource Technology, 20/08/2015, Vol. 197, Páginas 48 - 55, <DOI: doi:10.1016/j.biortech.2015.08.041>. 3.5. Effect of experimental cultures on fatty acids composition of <i>N. gaditana</i> .	1-21

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
12.06.2018

Examinador
M. González Rodríguez

Página
2/3

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N11/02 (2006.01)

C12N1/12 (2006.01)

C12N1/20 (2006.01)

C12M1/00 (2006.01)

C12M3/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C12M

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXPUS, TXPCN, TXPEP, TXPWO, NPL, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, MEDLINE, GOOGLE SCHOLAR, GOOGLE.