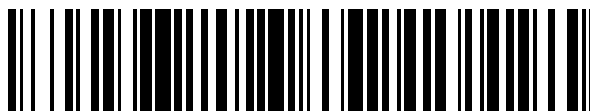


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 333**

51 Int. Cl.:

C12N 1/12 (2006.01)

C12N 1/38 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2014 E 14192180 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 3018198**

54 Título: **Método de cultivo de algas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.11.2018

73 Titular/es:

NESTE OYJ (50.0%)
Keilaranta 21
02150 Espoo, FI y
SUOMEN YMPÄRISTÖKESKUS SYKE (50.0%)

72 Inventor/es:

TANNER, REIJO;
SEPPÄLÄ, JUKKA;
TAMMINEN, TIMO;
SPILLING, KRISTIAN;
YLÖSTALO, PASI y
URONEN, PAULIINA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 690 333 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de cultivo de algas

5 **Campo de la invención**

La presente descripción se refiere al campo de la producción de lípidos a partir de algas. Proporciona un nuevo método que puede usarse para producir algas y biomasa algal con una mayor proporción de lípidos respecto a clorofila para la producción de biocombustible. La biomasa algal producida por el presente método es particularmente útil para cultivar algas para la producción de biocombustible u otros productos de refinación.

Antecedentes

Las algas se consideran como uno de los productores de materias primas de biomasa y biocombustible más prometedoras de nuestra economía en todo el mundo. Se estima que el potencial de producción regional del aceite algal está entre los mejores del mundo; las estimaciones realistas muestran que el aceite de algas podría producirse a gran escala con un rendimiento de 20-30 t/ha/año. Esto se puede comparar con otras productividades de aceite vegetal que varían desde menos de 1 a hasta 6 t/ha/año (por ejemplo, aceite de colza, aceite de palma). Además, el cultivo de algas puede ubicarse en áreas de tierra infértiles y de baja calidad. Además de los beneficios del uso de la tierra, el potencial de reducción de los gases de efecto invernadero es alto; Los cálculos muestran que las emisiones de los biocombustibles a base de aceite de algas pueden ser inferiores al 70-80 % en comparación con los combustibles fósiles. Es importante reconocer estos beneficios, ya que la industria de los biocombustibles busca constantemente materias primas y uso de la tierra más sostenibles, así como también encontrar nuevos métodos para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero. Por consiguiente, deben evaluarse cuidadosamente todas las nuevas opciones de materia prima antes de entrar en producción a gran escala.

Aunque las algas son bien conocidas como una opción potencial y respetuosa con el medio ambiente para la producción de materia prima para biocombustibles, hasta ahora los gastos de capital y operativos han sido demasiado altos para los mercados de combustibles de bajo valor. Por lo tanto, todos los pasos del proceso necesitan nuevas innovaciones que realicen la reducción en la necesidad total de capital. Los gastos de capital se deben principalmente al nivel de productividad del aceite. Un análisis más profundo en términos de "productividad del aceite" muestra que esta consta de dos partes: producción de biomasa y producción de lípidos. En la literatura científica está bien documentada una compensación entre estas propiedades y puede mejorarse la productividad del aceite mediante una cuidadosa selección de la cepa, eligiendo los protocolos de cultivo correctos y optimizando el tiempo de cosecha. Los métodos que aumentan la productividad del aceite son de suma importancia para disminuir las inversiones de capital.

Cuando se extrae el aceite de la biomasa algal, las clorofilas celulares tienden a entrar en la fracción de aceite y la concentración de clorofila puede ser tan alta como de 1-3 % en el aceite final. En el procesamiento del aceite vegetal, las concentraciones de clorofila de 30-100 ppm se consideran altas y se ha visto que causan problemas tanto en el pretratamiento como en el procesamiento catalítico del aceite. La clorofila no se puede eliminar del aceite por desgomado y el blanqueo no es económico incluso en el procesamiento de aceite vegetal, ya que exige una mayor cantidad de arcilla blanqueante que conduce a importantes pérdidas de aceite. En la etapa de refinación del aceite, las clorofilas son fuertemente adsorbidas en la entrada de los poros del catalizador, lo que conduce a velocidades de hidrogenación más lentas. Por lo tanto, ha sido difícil desarrollar procesos económicamente viables para la producción de lípidos algales que produzcan una cantidad suficientemente grande de lípidos en poco tiempo.

Los métodos anteriores para aumentar el contenido de lípidos en las algas a menudo han utilizado la limitación de nitrógeno, que también se ha informado que reduce los niveles de clorofila celular. La acumulación de lípidos tiene lugar durante condiciones de estrés cuando la división celular y la fijación de carbono están en desequilibrio y normalmente la limitación de nitrógeno se considera como una causa principal de acumulación de lípidos. Cuando comienza la limitación de nitrógeno, no pueden metabolizarse nuevas proteínas que contienen nitrógeno y la producción de otros compuestos, p. ej. lípidos e hidrocarburos, aumenta.

La fotoaclimatación es un fenómeno universalmente conocido, donde los pigmentos fotosintéticos se reducen en condiciones de alta iluminación para equilibrar la cantidad de luz cosechada frente a la cantidad de energía que las células pueden usar. Tradicionalmente, la investigación sobre algas se ha centrado en explorar las tasas de crecimiento en diferentes niveles de luz y en la estimación de la eficacia fotosintética en diferentes condiciones de luz.

Hasta ahora, se ha alcanzado una alta productividad de lípidos en algas mediante un proceso de cultivo en dos etapas: se produce la primera biomasa que comprende algas y, a continuación, las células se llevan a la deficiencia de algún mineral (nitrógeno, fósforo o sílice). Durante esta etapa de inanición, las células comienzan a almacenar lípidos o almidón en sus células, porque su capacidad para producir biomasa normal es limitada.

La etapa de inanición no es fácil de alcanzar en cultivo con una alta biomasa algal y lleva mucho tiempo, desde

muchos días hasta semanas. Se ha evaluado que la etapa de engorde, durante la cual se acumulan los lípidos, puede durar de varios días a semanas desde el comienzo de la inanición en los cultivos algales, que es demasiado largo para cultivar algas para la producción de combustible. Los métodos anteriores no han tenido éxito en pasar las células algales lo suficientemente rápido de la fase de crecimiento a la fase de producción de aceite para proporcionar biomasa algal rica en lípidos para la producción de biocombustible.

El documento WO2012/006302 describe un método para cultivar microalgas *Chlorococum pabirum* y aumentar la producción de aceite. La acumulación de aceite se indujo por medio deficiente en nitrógeno o fósforo, o mediante la iluminación continua de las células de microalgas durante todo el tiempo de cultivo con una intensidad de luz superior a, al menos, $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (p.5-6). El contenido de aceite de algas podría aumentarse con estos métodos en entre una semana a diez días. La combinación de la deficiencia de nitrógeno con la iluminación de luz de elevada intensidad constante durante toda la etapa de cultivo aumentó adicionalmente la velocidad de acumulación de aceite pero no el contenido de aceite final (Ejemplo 3).

El documento US2012/0077253 divulga un método para cultivar algas en un fotobiorreactor con una tasa de crecimiento óptima y constante durante períodos de tiempo más largos [0054-0056]. La masa de células algales se monitoriza y controla durante el cultivo para mantener la proporción de fotones emitidos respecto a densidad celular en un intervalo definido aumentando o disminuyendo la exposición a la luz y/o la masa algal. El método proporciona una producción de aceite óptima solamente cultivando dentro del intervalo de irradiación de luz específico ideal de la cepa algal y evitando altas picos en la irradiancia de la luz [0066]. Durante la fase de crecimiento, se debe mantener el nivel deseado de irradiación específica [0067].

La acumulación de lípidos es un paso importante en el cultivo de biomasa algal, ya que los lípidos de almacenamiento suelen ser lípidos neutros, como los triglicéridos, que pueden usarse fácilmente como materia prima en el procesamiento de biocombustibles. Los lípidos estructurales, por el contrario, son principalmente lípidos polares, como los fosfolípidos y los glucolípidos. Por lo tanto, durante la inanición aumenta la cantidad absoluta de lípidos neutros celulares y aumenta la proporción de lípidos neutros frente a polares.

Por lo tanto, es un objeto de la presente invención resolver o aliviar al menos algunos de los problemas previos de la técnica anterior.

Sumario de la invención

Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que la cantidad de clorofila puede reducirse y el contenido lipídico aumentarse en células algales agotando las células de nutrientes, especialmente nitrógeno, hasta un nivel que causa estrés nutricional y exponiendo las células esencialmente al mismo tiempo a luz de alta intensidad. Con el presente método el cambio a la fase de acumulación de lípidos se logra mucho más rápido que con métodos convencionales, lo que acorta el tiempo total requerido para el cultivo y la producción de lípidos y hace que el método sea particularmente útil y económicamente viable para producir algas enriquecidas en lípidos para la producción de biocombustibles.

En el presente documento se divulga un método para producir células algales, que comprende las etapas de:

- a. cultivar células algales en condiciones de cultivo y en una cantidad de luz que mantenga el crecimiento;
 - b. agotar las células algales de al menos un nutriente inorgánico; y
 - c. exponer de manera continua las células algales a una cantidad de luz que es mayor que en el paso a.;
- en el que el paso b y el paso c. comienzan esencialmente al mismo tiempo.

El método tiene la ventaja de un cambio más rápido de las células algales cultivadas desde la biomasa hasta la fase de acumulación de lípidos. Por consiguiente, el presente método es útil para producir biomasa algal para la producción de biocombustibles.

Otra ventaja es que la proporción lípido-clorofila de las células algales aumentó notablemente. Las células que habían experimentado la innovadora inanición de nutrientes y el tratamiento de elevada luz pasaron rápidamente, incluso en horas, de la etapa de crecimiento a la etapa de producción de lípidos, contenían 140 % más de lípidos que los alcanzados con métodos de cultivo tradicionales (normalmente durante días-semanas) y un menor contenido de clorofila que mejoró su proporción lípido:clorofila en 17 veces.

En el presente documento se divulga un alga producida utilizando el método anterior.

El alga y la masa algal que comprende las células algales producidas contienen más lípidos y menos clorofila que las células algales correspondientes cultivadas utilizando métodos anteriores conocidos hasta la fecha. El alga producida de acuerdo con el método anterior encuentra un uso particular en la producción de biocombustible.

La biomasa que comprende células algales producidas con el presente método puede producirse en un tiempo de cultivo más corto y las células algales están enriquecidas en lípidos y contienen menos clorofila de lo que se puede lograr con métodos de la técnica anterior.

5 En el presente documento se describe un extracto de lípidos que se puede obtener extrayendo lípidos algales producidas usando el presente método. La extracción de lípidos se puede llevar a cabo usando cualquier método conocido en la técnica para extraer lípidos de células algales.

10 En el presente documento se divulga un biocombustible que se puede obtener convirtiendo los lípidos del alga producida usando el método anterior y/o el extracto lipídico anterior en un biocombustible.

15 En el presente documento se divulga el uso de la presente alga y/o el presente extracto lipídico en la producción de combustible. Debido al mayor contenido de lípidos y al menor contenido de clorofila, así como un cambio más rápido de la fase de crecimiento a la fase de producción de lípidos, el uso es particularmente ventajoso ya que acorta el tiempo total de procesamiento en la producción de combustible y simplifica la producción al disminuir la necesidad de eliminar la clorofila.

20 De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para producir biocombustible renovable que comprende: cultivar células algales de acuerdo con el presente método, aislar los componentes lipídicos de las algas cultivadas; y someter los componentes lipídicos aislados a reacciones químicas para generar hidrocarburos o alquilésteres de ácidos grasos mediante los cuales se produce biocombustible renovable.

25 De acuerdo con el séptimo aspecto, se proporciona un método para aumentar la proporción de lípidos neutros respecto a clorofila en las células algales para la producción de biocombustible que comprende

a. cultivar células algales en condiciones de cultivo, utilizando un ciclo día-noche que comprende un período de luz y un período oscuro y en una cantidad de luz, que mantenga el crecimiento y determinar el tiempo requerido para una división celular del alga en dichas condiciones de cultivo:

30 b. agotar las células algales de al menos un nutriente inorgánico, cuyo nutriente inorgánico es nitrógeno inorgánico: y

c. exponer, durante el período de luz, las células algales continuamente a una cantidad de luz que tiene una intensidad que corresponde o excede el nivel de luz de $1,5 \times E_k$ de dicha alga y que es mayor que en la etapa a.;

35 en la que el nivel de nitrógeno inorgánico está determinado y la etapa b. y la etapa c, se inician en un momento que ocurre durante una división celular antes y una división celular después del tiempo en que el nitrógeno inorgánico está por debajo del límite de detección en el medio de cultivo celular.

40 En el presente documento se divulga el uso del extracto lipídico para reducir el bloqueo del catalizador en una unidad de conversión de biocombustible, en el que el aceite de alga se convierte en componentes del biocombustible. El presente extracto de lípidos también es útil para mejorar la conversión catalítica de lípidos en el biocombustible. El presente extracto lipídico es particularmente útil en la producción de biocombustibles mejorando el rendimiento de los catalizadores necesarios en la conversión de lípidos algales en biocombustible debido al menor contenido de clorofila y al alto contenido de lípidos neutros de los lípidos algales producidos de acuerdo con el presente método.

50 Sin limitar las ventajas anteriores, el presente método, productos y usos se mejoran sobre lo que se puede lograr con métodos de cultivo anteriores porque el método actual cambia las células algales de manera más rápida de la etapa de crecimiento a la etapa de producción de lípidos y produce algas con aumento de la proporción de lípidos respecto a clorofila.

55 Se ilustrarán diferentes realizaciones de la presente invención o se han ilustrado solamente en conexión con algunos aspectos de la invención.

Breve descripción de las figuras

60 **La figura 1** revela el desarrollo de concentraciones de clorofila y nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$) durante el primer experimento de luz. Las variaciones diarias se deben a diluciones con medios frescos. En los días 12 y 17, el cultivo se diluyó con medios libres de nitrógeno, causando un descenso en las concentraciones de NO_3 . Se muestran en las barras grises los períodos experimentales de cambio de luz cuando se tomaron submuestras para diferentes tratamientos de luz. La clorofila se mide analíticamente o se estima a partir de fluorescencia. El nitrato se mide en los días 11-15.

65 **La figura 2** revela dosis de luz durante los periodos experimentales de cambio de luz y el momento de los tiempos de muestreo. Las luces se apagaron durante el período nocturno.

5 **La figura 3** revela el Experimento de luz 1. Desarrollo del número de células de *P. tricornutum* CCAP 1055/1, fluorescencia (relativa) de Chl (clorofila), fluorescencia del Rojo Nilo (relativa), fluorescencia del Rojo Nilo específica de las células, eficacia fotosintética QY (relativa), peso seco y nitrato en diferentes niveles de luz tanto en la fase de crecimiento exponencial como estacionario (inanición de nitrógeno). Obsérvese las diferencias en las escalas y.

10 **La figura 4** revela la tasa de crecimiento para el experimento de luz 1. Arriba a la izquierda; Crecimiento del número de células en fase exponencial (0-27 horas), Arriba a la derecha; Crecimiento del número de células en fase estacionaria (0-11 horas), abajo a la izquierda; Crecimiento de lípidos (como Rojo Nilo) en fase exponencial (0 -27 horas), Abajo a la derecha; Crecimiento de lípidos en fase estacionaria (0-11 horas). Obsérvese diferente escala y.

15 **La Fig. 5** revela el desarrollo de la proporción de lípido respecto a clorofila en el experimento con luz durante las fases exponencial y estacionaria. En las cifras más bajas, los valores se han llevado a escala 1 al comienzo de los experimentos. Los resultados a escala para la fase estacionaria muestran el aumento de más de 14 a 17 veces en la proporción de lípidos:chl debido al tratamiento de elevada luz.

20 **La figura 6** revela el experimento de luz 2. Desarrollo del número de células de *P. tricornutum* CCAP 1055/1, fluorescencia de Chl, fluorescencia del Rojo Nilo, fluorescencia del Rojo Nilo específica de las células, eficacia fotosintética, proporción de la concentración de lípidos (roja del Nilo) respecto a clorofila, peso seco y nitrato bajo inanición de nitrógeno en diferentes niveles de luz/tratamientos durante un período de tiempo de 34 h.

25 **La figura 7** revela el experimento de luz 3. Desarrollo del número de células de *C. vulgaris*, fluorescencia de Chl, fluorescencia del Rojo Nilo, células específicas de la fluorescencia del Nilo Rojo y la absorción de clorofila como indicación de la concentración de clorofila, en condiciones de inanición de nitrógeno en dos niveles de luz diferentes durante un período de tiempo de 37 h.

30 **La figura 8** revela el experimento de luz 3. Desarrollo de la proporción de lípido respecto a clorofila en el experimento con luz durante la transición de la fase exponencial a la estacionaria.

Descripción detallada

35 Las condiciones de cultivo que mantienen el crecimiento en los presentes métodos son las condiciones de cultivo en las cuales las células algales crecen y se dividen. Se puede usar cualquier medio de crecimiento normalmente utilizado en el cultivo de algas. La cantidad de luz que mantiene el crecimiento es la intensidad de luz recibida por una célula algal que es suficiente para permitir que la célula crezca y se divida en las condiciones seleccionadas que mantienen el crecimiento de células algales y que no inhiben la acumulación de masa de células algales.

40 El agotamiento de un nutriente inorgánico se puede lograr al no complementar el medio de crecimiento con el nutriente inorgánico después de que se haya logrado la concentración de biomasa deseada, por lo que el nutriente inorgánico es consumido por las células algales. Como alternativa, las células pueden cosecharse por centrifugación o por otros medios adecuados para separar células viables del medio de crecimiento y transferirse a un nuevo medio de crecimiento agotado de al menos un nutriente inorgánico. Sin embargo, se puede usar cualquier método
45 adecuado para alcanzar una situación en la que las células se encuentren en un medio sin al menos un nutriente inorgánico.

50 En ciertas realizaciones de la presente invención, el nivel al que se agota el nutriente inorgánico es suficientemente bajo para inducir estrés nutricional en las células algales. El nutriente inorgánico agotado puede ser nitrógeno y el nivel que induce estrés nutricional puede ser DIN = 0 (DIN = nitrógeno inorgánico disuelto), que puede determinarse mediante métodos conocidos en la técnica. El nivel puede ser tan bajo como el nivel de detección del nitrógeno inorgánico, o DIN = 0.

55 Exponer las células algales en el paso c. de manera continua a una cantidad de luz que es mayor que la utilizada para cultivar células en el paso a. puede realizarse usando cualquier fuente de luz que sea capaz de proporcionar suficiente luz para alcanzar los objetivos de la invención.

60 La etapa b, se inicia esencialmente al mismo tiempo con la etapa c. Preferentemente, la etapa c. de exposición a la luz se inicia en un momento que ocurre durante una división celular antes y una división celular después del tiempo en que el nutriente inorgánico disuelto está por debajo del límite de detección en el medio de cultivo celular, En una realización, la exposición a la luz se inicia justo antes de que la mayoría de las células algales se hayan dividido por última vez antes del agotamiento del nutriente inorgánico. Como es bien sabido en la técnica, el período de tiempo para una división celular puede variar dependiendo de las condiciones de cultivo y el período de tiempo para una división celular se puede determinar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, Por consiguiente, el momento
65 apropiado para comenzar el tratamiento con luz de la etapa c. puede determinarse fácilmente midiendo la concentración del nutriente inorgánico y el período de tiempo para la actividad de división celular, Por tanto, un

experto puede comenzar las etapas b. y c, esencialmente al mismo tiempo, es decir., no antes ni después de una división celular desde el momento en que la cantidad de nutrientes inorgánicos disminuye, o se estima que disminuye, por debajo del límite de detección.

- 5 El presente método proporciona biomasa de células algales que tiene un alto contenido de lípidos y un bajo contenido de clorofila. Dicha biomasa es ventajosa en la producción de biocombustible, ya que reduce la necesidad de eliminar la clorofila de la biomasa y proporciona más lípidos para convertirse en un biocombustible.

10 En una realización, el método anterior es para aumentar la proporción de lípidos neutros respecto a clorofila en un alga o en el extracto lipídico producido a partir del alga.

15 En una realización de ejemplo, el nutriente inorgánico que se agota en los presentes métodos puede ser nitrógeno, fósforo o sílice. Se prefiere el agotamiento del nitrógeno inorgánico porque es un método comúnmente utilizado y muy eficiente para inducir la acumulación de lípidos en las células algales. Sin embargo, también pueden usarse otros nutrientes como fósforo o sílice para inducir la acumulación de lípidos.

20 En una realización de ejemplo, la etapa anterior c. continúa durante al menos tres horas. La etapa c también se puede llevar a cabo durante más de tres horas, tal como 3,5 h, 4 h, 4,5 h, 6 h, 6,5 h, 7 h, 7,5 h, 8 h, 9 h, 9,5 h, 10 h, 10,5 h, 11 h, 11,5 h, 12 h o más. Sin embargo, tres horas es suficiente para aumentar, en comparación con el alga de control, el contenido de lípidos y disminuir el contenido de clorofila a niveles que hacen que las algas sean adecuadas para la producción de biocombustible.

25 En una realización de ejemplo, las células algales se recogen 12 horas o más después de la inducción del agotamiento de nutrientes. En una realización de ejemplo preferida, las células algales se recogen 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 o 36 h después de la inducción del agotamiento de nutrientes.

30 En otra realización de ejemplo, las células algales se recogen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días después de inducir el agotamiento de nutrientes.

35 En una realización de ejemplo, la cantidad de luz a la que está expuesta la célula algal en la etapa c, corresponde o supera a E_k , es decir, la cantidad de radiación a la que la fotosíntesis deja de estar limitada por la luz. El parámetro de saturación de luz E_k se da como $E_k = \mu_{max} / \text{alfa}$, donde alfa es la pendiente inicial entre la tasa de crecimiento y la relación de irradiancia para un alga dada. En algún nivel de irradiancia, las tasas de crecimiento alcanzan una meseta. La tasa de crecimiento saturado de luz se denota como μ_{max} . Un experto puede determinar fácilmente el E_k de cualquier especie de algas usando métodos conocidos en la técnica. En una realización, se lleva a cabo la etapa c. exponiendo el alga a una cantidad de luz que tiene una intensidad que corresponde o excede el nivel de luz de E_k , $1,5 \times E_k$, $2 \times E_k$ o $3 \times E_k$ de dicha alga. Preferentemente, la cantidad de luz tiene en la etapa c. una intensidad igual o inferior a la necesaria en μ_{max} .

40 En una realización de ejemplo la cantidad de luz en la etapa c. puede ser al menos 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1550, 1600, 1650, 1700, 1750, 1800, 1850, 1900, 1950 o 2000 $\mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

45 En una realización en la etapa a. la cantidad de luz a la que está expuesta la célula tiene una intensidad inferior al E_k de dicha alga.

50 En una realización de ejemplo, el cultivo se realiza usando un ciclo de luz día-noche. Ejemplos de ciclos de luz día-noche de acuerdo con la invención son 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (ciclo 12-12), ciclo 11 -13, ciclo 8-16 o cualquier período de luz-oscuridad que se produzca de manera natural, o un ciclo que imite la periodicidad normal entre el día y la noche. El período de exposición a la luz en la etapa c. se da e incluye en el período de luz para mantener la duración total del ciclo sin cambios durante el método.

55 En una realización de ejemplo, el tratamiento de elevada iluminación se da al comienzo del período de día y la cantidad de luz se mantiene esencialmente constante durante el resto del período de día. Preferentemente, la cantidad de luz que recibe la célula se mantiene a un nivel alto esencialmente constante durante el tratamiento con luz y a un nivel inferior esencialmente constante durante el resto del período de día.

60 En una realización de ejemplo, la etapa anterior c. se repite al inicio de cada período de días sucesivos, siempre que el método continúe y hasta que se coseche la biomasa algal.

65 Las células algales preferentemente comienzan a exponerse al tratamiento con luz cuando todavía no han entrado en la fase de crecimiento estacionario. Sin embargo, el contenido de lípidos puede aumentar y el contenido de clorofila disminuir con el presente método también en el caso en que las células hayan alcanzado la fase estacionaria. En cualquier caso, el tratamiento con luz no se administra hasta que haya comenzado el agotamiento

nutricional.

Ejemplos

- 5 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar varios aspectos de la presente invención. No se pretenden limitar la invención, que se define por las reivindicaciones adjuntas.

10 Se estudiaron los efectos de la luz y la inanición en las células algales tanto en células algales en crecimiento activo (crecimiento exponencial) como en células algales que habían alcanzado la fase estacionaria. Se probaron cuatro niveles de luz, concretamente 60, 200, 600 y 1700 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, que representaban el nivel de cultivo de algas penetrantes a la luz solar normal a profundidades de 2,2, 1,4, 0,7 y 0 cm (suponiendo concentraciones de biomasa algal como 1 g DW L^{-1} , Contenido de clorofila del 1 % de DW). El nivel de luz básico 60 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fue el valor de control de referencia al que se comparó el impacto del aumento de luz. Debido a que el nivel 200 fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ era lo suficientemente alto como para ver efectos claros en la fisiología y comportamiento de las células algales como productores de lípidos, pudimos identificar la relación del nivel mínimo de luz que conduce a impactos fuertes y la relación de crecimiento-irradiancia específica de las especies. Se realizaron experimentos separados con dosificación de luz continua y con pulsos en escala de segundo o minuto. Se obtuvieron los mejores resultados, es decir, el cambio más rápido a la fase de acumulación de lípidos y la mayor proporción de lípidos:clorofila de las células algales, cuando se administró luz adicional de manera continua al menos durante tres 20 horas.

25 La biomasa algal se produjo con la tasa de crecimiento específico máximo y el nivel de nitrógeno se controló cuidadosamente de modo que el experimento de fotoactivación se inició inmediatamente cuando el nitrógeno inorgánico estaba por debajo del límite de detección en el medio de cultivo. La densidad celular experimental fue intencionadamente baja para evitar el sombreado celular y proporcionar las mismas condiciones de luz a todas las células durante todo el tiempo de cultivo.

30 Las algas producidas utilizando el presente método tenían un alto contenido de lípidos y menor contenido de clorofila que el obtenido en las condiciones de referencia. Las presentes algas son especialmente útiles cuando se usan para la producción de biocombustible porque, además de un alto contenido de lípidos, las células algales contienen menos clorofila, lo que causa problemas en la producción de lípidos y es difícil de eliminar de la biomasa algal.

Ejemplo 1

35 El primer ejemplo se realizó con *P. tricornutum* CCAP 1055/1, ya que tiene una alta tasa de crecimiento, es fácil de cultivar y el análisis de clorofila es fiable. Las células se cultivaron en medios repletos de N usando salinidad de 6PSU (8,12 mg de $\text{NO}_3\text{-N}$). Las algas se cultivaron a 60 μmol q $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y se mantuvieron en la fase exponencial diluyendo con medios de cultivo repletos de nutrientes. La concentración de algas se mantuvo baja para evitar la auto-sombreado. Las diluciones diarias mantuvieron los niveles de clorofila relativamente bajos (alrededor de 100- 40 200 μg L^{-1}) y, por lo tanto, las condiciones de luz dentro de las unidades de cultivo se mantuvieron similares durante todo el experimento (Figura 1). Con estos niveles de clorofila, aproximadamente el 80-90 % del nitrógeno se encuentra en una forma inorgánica (NO_3) y solo el 10-20 % se absorbe en las células. El volumen de cultivo se incrementó gradualmente durante el experimento, desde 1.8 L al comienzo hasta 15-17 L en los días experimentales. Esto permitió tener varias unidades (cada 1.5 L) para experimentos de cambio de luz. Los experimentos de cambio de luz se iniciaron el día 12 (fase de crecimiento exponencial) y el día 17 (fase de crecimiento estacionario) (Figura 1). En el experimento, el cultivo de algas se dividió en varias submuestras, que se incubaron en diferentes tratamientos de luz. Se realizó un tratamiento de luz con una duración de 27 horas usando cuatro niveles de luz (60, 200, 600 y 1700 μmol q $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Fuente de luz LED SL 3500, Photon Systems Instruments), los niveles de luz más bajos y más altos tenían cultivos replicados. En todos los experimentos de luz, las luces se apagaron durante la noche (apagado después de las mediciones de 12 horas y se encendieron en el muestreo para las mediciones de 24 horas) (Figura 2). Los cultivos se mantuvieron en botellas de policarbonato de 2 L con aireación continua (capacidad de la bomba de aire de 550 ml/h), que es suficiente para mantener el pH y los niveles de carbono inorgánico constantes cuando se utiliza una biomasa tan baja. Se utilizó una ventilación elevada y se eliminó la mayor parte del oxígeno disuelto y se incorporó suficiente dióxido de carbono para garantizar que el CO_2 55 no podría ser un factor limitante del crecimiento en nuestros ensayos. Se midió el fósforo inorgánico durante los experimentos de cambio de luz y siempre fue superior a 0,4 mg L^{-1} , por lo tanto en exceso para el crecimiento algal. El primer período de medición se realizó en la fase exponencial. El segundo período de medición tuvo lugar en la transición a la fase estacionaria, al inicio de la limitación de nutrientes. Para este propósito, parte del cultivo original se cultivó a 60 μmol q $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ hasta que se agotó el NO_3 (Figura 1).

60 En el experimento, se midió la cantidad de células (FlowCAM), la acumulación de lípidos (Rojo Nilo) y la fotofisiología de las células (AquaPen). Las mediciones fotofisiológicas incluyeron absorción de luz, contenido de chl y actividad fotoquímica usando técnicas de fluorescencia variables. Esta última se midió utilizando la técnica de curva de fluorescencia-irradiancia (curvas rápidas de luz, Suggett et al 2003). Para este análisis, se tomaron submuestras de cada cultivo, como para otros análisis y se midieron las curvas de inducción de fluorescencia usando varios niveles de luz. A partir de la respuesta de fluorescencia frente a las curvas de nivel de luz, se 65

calcularon los parámetros típicos de fotosíntesis de producción (MacIntyre et al 2002).

En la fase exponencial, la dosis de luz afectó la tasa de crecimiento, pero claramente el crecimiento ya estaba saturado a $200 \mu\text{mol q m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figuras 3 y 4). Con la luz más baja, el número de células aumentó 2,5 veces, mientras que en irradiaciones más altas el aumento fue de 3 veces. Los análisis de nutrientes mostraron las concentraciones promedio de nitrato y fosfato a 7600 y $590 \mu\text{g L}^{-1}$. Estos valores son muy altos y durante el período experimental casi no se observó ninguna disminución (Figura 3). Basándose en las mediciones de fluorescencia variable, las células que crecen a mayor nivel de luz se vieron un tanto estresadas por el exceso de luz. En ese nivel de luz Fv/Fm (o QY) los valores fueron de alrededor de 0,50, mientras que otros cultivos mostraron valores de alrededor de 0,60, lo que es típico de células sin estrés (Seppälä 2009). Como una aclimatación a la luz alta, la concentración de clorofila o la fluorescencia no cambiaron tanto como el número de células (Figuras 3 y 5). Mientras que las células se dividían más rápido con mucha luz que con poca luz, no producían clorofila nueva con mucha luz. Esto es claramente visible en los resultados del contenido de clorofila celular, que muestra un 50 % de disminución del contenido de clorofila en un día (Figura 5). La proporción de clorofila respecto a peso en seco (Figura 5) no mostró una disminución similar en el contenido de clorofila, pero debe tenerse en cuenta que las mediciones de peso en seco no fueron muy fiables, especialmente para las muestras tomadas en las primeras horas de la fase exponencial. Parte del exceso de energía de la luz se utilizó en la formación de los lípidos y el contenido de lípidos de las células con mayor luz fue 2 veces mayor que los de $60 \mu\text{mol q m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 3). Cuando esto se combina con la disminución del contenido de clorofila, la proporción lípido-clorofila aumentó rápidamente y fue 2,5-3,5 veces mayor en los niveles de irradiancia saturada, en comparación con la irradiancia de crecimiento a $60 \mu\text{mol q m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 3). Al observar la tasa de producción de lípidos, gran parte de las diferencias entre los cultivos parecen deberse a la disminución de la tasa de producción de lípidos con la luz más baja (Figura 4). En otros cultivos, la tasa de producción de lípidos es ligeramente superior a la tasa de crecimiento celular, como también se observa en aproximadamente un 20-40 % de aumento de sus lípidos por cantidad de células.

En el inicio de la fase estacionaria, el crecimiento celular fue bastante similar en el nivel de luz más bajo al de la fase exponencial. En niveles de luz más altos, el crecimiento fue incluso mayor que durante la primera parte del experimento. Los resultados de nutrientes indicaron que el nitrógeno se consumió al inicio de la segunda parte del experimento y, por lo tanto, no limitaba el crecimiento en gran medida (Figura 3). Como primer signo de la limitación de nitrógeno, el contenido de clorofila no aumentaba con la misma velocidad que el número de células, lo que provoca una disminución más rápida del contenido de clorofila celular, incluso en el nivel de luz más bajo. Los niveles de fluorescencia variable fueron bastante altos para el primer período de luz, excepto para el tratamiento con mayor luz que indicó un mayor estrés lumínico que durante la fase de crecimiento exponencial. Los valores más altos se acercan al máximo teórico de 0,65-0,70 que se puede obtener en células sanas (Seppälä 2009). También la fluorescencia de clorofila cayó en aquellas muestras, lo que indica que la fluorescencia se reduce por inactivación no fotoquímica. Con la luz más alta, en comparación con el nivel de luz más bajo, la concentración de clorofila disminuyó un 35 % durante 24 horas. Como el número de células era bastante similar en los niveles más bajos y más altos de luz, al final del experimento de fase estacionaria, la cuota de clorofila celular también disminuyó aproximadamente un 30 % debido al tratamiento con luz intensa (Figura 3).

Los lípidos comenzaron a aumentar rápidamente después de agotarse el nitrógeno. En 11 horas, la fluorescencia del Rojo Nilo fue de 4 a 7 veces en comparación con el inicio del período (Figura 3), lo que resultó en tasas de producción mucho más altas que la tasa de crecimiento celular (Figura 4). Junto con la disminución del contenido de clorofila, el cambio en la proporción de lípidos respecto a clorofila fue aún más dramático. El aumento duró todo el experimento, y al final se observó un aumento de hasta 17 veces en la proporción (Figura 5 y Tabla 1).

En la fase estacionaria, parece que el estrés nutricional combinado con un alto estrés lumínico disminuyó el crecimiento, causó una gran disminución de la fluorescencia de Chl (inactivación no fotoquímica o fotodaño) y una disminución de la actividad fotoquímica. Sin embargo, en el aumento de lípidos fue igual en todos los cultivos de luz alta. La disminución relativa de la clorofila en la célula cuando se cultiva con mucha luz no comprometió la producción de lípidos.

Tabla 1. Aumento relativo de la fluorescencia del Rojo Nilo y proporción entre la fluorescencia del Rojo Nilo y la concentración de clorofila durante el experimento de Luz 1.

Exponencial							
Aumento de Lípidos [FI de Rojo Nilo]							
Irradiancia	Tiempo						
	0	1	4	8	12	24	27
60	1,00	1,03	0,97	0,40	0,54	1,32	1,40
60	1,00	1,06	1,05	0,41	0,46	1,31	1,34
200	1,00	1,10	1,40	1,37	2,27	2,46	3,06
600	1,00	1,17	1,58	1,52	2,38	2,57	3,75
1700	1,00	1,07	1,75	1,89	2,64	3,09	3,49

1700	1,00	1,10	1,66	1,67	2,80	2,82	3,28
Aumento de Lípidos frente a Chl [FI del Rojo Nilo. / Chl µgL-1]							
				Tiempo			
Irradiancia	0	1	4	8	12	24	27
60	1,00	1,06	0,89	0,33	0,39	0,81	0,82
60	1,00	1,02	0,93	0,31	0,32	0,78	0,76
200	1,00	1,06	1,34	1,32	2,06	1,77	2,11
600	1,00	1,18	1,54	1,42	2,18	1,92	2,66
1700	1,00	1,05	1,73	1,86	2,71	2,56	2,81
1700	1,00	1,09	1,58	1,67	2,88	2,24	2,48
Estacionaria							
Aumento de Lípidos [FI de Rojo Nilo]							
				Tiempo			
Irradiancia	0	1	4	8	12	24	27
60	1,00	11,02	1,63	2,67	3,80	5,61	6,96
60	1,00	1,06	1,26	2,26	3,76	5,68	7,73
200	1,00	0,93	1,79	4,10	6 65	10,93	12,82
600	1,00	1,11	2,29	5,20	7,02	11,98	13,56
1700	1,00	1,02	1,68	4,14	6,05	10,77	11,42
1700	1,00	0,89	1,83	4,30	6,05	10,61	11,98
Aumento de Lípidos frente a Chl [FI del Rojo Nilo. / Chl pgL-1]							
				Tiempo			
Irradiancia	0	1	4	8	12	24	27
60	1,00	1,02	1,54	2,34	3,30	5,20	6,42
60	1,00	1,07	1,18	2,01	3,28	5,47	7,38
200	1,00	0,94	1,74	3,96	6,41	12,23	14,38
600	1,00	1,08	2,22	5,17	7,12	14,18	16,51
1700	1,00	0,99	1 66	4,36	6,53	15,57	17,28
1700	1,00	0,89	1,77	4,58	6,79	15,40	16,86

Ejemplo 2

5 El segundo experimento reprodujo parcialmente el primer experimento, pero solo se usaron niveles de luz de 60 y 200 $\mu\text{mol q m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y el período de medición estaba en la transición a la fase estacionaria solamente. Además, se probó si el modo de suministrar luz en diferentes pulsos tiene un efecto sobre la acumulación de lípidos y la fotofisiología. Esto se hizo aplicando luz pulsada durante los períodos de medición. Los pulsos se realizaron a una escala de segundos-min (luz tenue de 45 seg, luz elevada de 15 seg) o a escalas de hora-min (luz tenue de 45 min, luz intensa de 15 min). Los niveles de luz fueron luz tenue = 60 $\mu\text{mol q m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y luz elevada = 600 $\mu\text{mol q m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La dosis de luz acumulada para ambos tratamientos de luz pulsada es igual a la que tiene un nivel continuo de 200 $\mu\text{mol q m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

15 El crecimiento celular fue más alto a luz constante a 200 $\mu\text{mol q m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 6). De manera similar, se obtuvo el mayor rendimiento de lípidos (absoluto, por célula o por clorofila) con este tratamiento. A partir de las curvas de crecimiento parece evidente que las células no pudieron usar la energía extra proporcionada por los pulsos de luz. El número de células era incluso ligeramente más bajo con luz pulsada que en condiciones de poca luz. El nivel de luz pulsada o especialmente más elevada disminuyó la eficacia fotosintética durante el experimento.

20 El contenido de clorofila de las células (Figura 7) disminuyó como en el primer experimento, pero nuevamente, los tratamientos pulsados parecieron no influir en el contenido de clorofila celular. El efecto del tratamiento con luz sobre la absorción espectral fue menor que en el primer experimento. Del mismo modo, en la relación de luz-fluorescencia, los parámetros tenían intervalos bastante similares en luz baja y alta y en condiciones de luz pulsada. Esto indica una capacidad de aclimatación a la luz dinámica muy baja de las células durante este experimento, como durante la última parte del primer experimento. Las ligeras diferencias en la pigmentación y el contenido de lípidos entre el primer y segundo experimento pueden explicarse por ligeros cambios en el estado nutricional de las células. Al

observar las concentraciones de nitrógeno, se encuentran valores similares observados en la etapa inicial del segundo experimento (aproximadamente 30 $\mu\text{g NO}_3\text{-N L}^{-1}$) a las 2-3 horas en el primer experimento. Como la absorción de NO_3 puede haber sido baja durante el período de oscuridad, la diferencia real entre los progresos de la limitación de nitrógeno puede ser algo mayor que esta diferencia de tiempo. Los resultados indican que los valores al

5 comienzo del segundo experimento son bastante similares a los valores a las 4-11 horas en el primer experimento (fase estacionaria). Por lo tanto, podemos considerar que el segundo experimento muestra un caso en el que la limitación de nutrientes se ha desarrollado un poco más que en el primer experimento. Esto puede explicar en parte por qué en el segundo experimento las respuestas fueron más débiles que en el primer experimento; las células ya

10 tenían más nitrógeno limitado en el segundo.

Es probable, a partir de los datos experimentales recopilados aquí, que la escala de tiempo para los cambios en pigmentación y acumulación de lípidos es de horas a días, ya que los pulsos de luz más cortos de escala minutos o segundos no causaron una aclimatación tan fuerte.

15 **Ejemplo 3**

El experimento se llevó a cabo utilizando el alga verde *Chlorella vulgaris*. Basándose en el experimento anterior, únicamente usamos dos tratamientos con luz, y las muestras se tomaron al principio y al final de los períodos de luz, durante dos días. Entre las horas experimentales 11 a 24, las células estaban en oscuridad, mientras que en el resto

20 de horas a irradiancias dadas. Al igual que en los experimentos previos, las células se cultivaron primero con la menor irradiancia (en este caso, 80 $\mu\text{mol q m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Al inicio de la fase exponencial a la estacionaria, que se debe al agotamiento de nitrógeno, el cultivo se dividió en cuatro botellas,

C. vulgaris mostró un alto crecimiento, tanto en el número de células como en los lípidos, a elevada luz (Figura 8). El tiempo de aumento de lípidos se produjo después de que el crecimiento celular se hubiera detenido, después del

25 primer período de luz durante condiciones de nitrógeno limitado. La detención del crecimiento celular fue muy rápida y el aumento de los lípidos celulares fue el doble. La mayor dosificación de luz dio como resultado una proporción algo más alta de lípidos respecto a clorofila. La pigmentación no respondió al aumento del nivel de luz, aunque se observó un ligero aumento de la proporción de absorción de azul a rojo en la última muestra con elevada luz.

La descripción anterior ha proporcionado, a modo de ejemplos no limitativos de implementaciones y realizaciones

30 particulares de la invención, una descripción completa e informativa del mejor modo actualmente contemplado por los inventores para llevar a cabo la invención. Sin embargo, es evidente para un experto en la materia que la invención no está restringida a detalles de las realizaciones presentadas anteriormente, sino que puede implementarse en otras realizaciones usando medios equivalentes o en diferentes combinaciones de realizaciones sin desviarse de las características. de la invención.

35

Por tanto, la descripción anterior se considerará meramente ilustrativa de los principios de la presente invención, y no como limitación de la misma. Por lo tanto, el alcance de la invención solo está restringido por las reivindicaciones de patente adjuntas.

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para aumentar la proporción de lípidos neutros respecto a clorofila en células algales para la producción de biocombustible, que comprende
- 10 a. cultivar células algales en condiciones de cultivo, utilizando un ciclo de día-noche que comprende un período de luz y un período oscuro y en una cantidad de luz que mantenga el crecimiento y determinar el tiempo requerido para una división celular del alga en dichas condiciones de cultivo;
- 10 b. agotar en las células algales al menos un nutriente inorgánico, siendo el nutriente inorgánico nitrógeno inorgánico; y
- 15 c. exponer, durante el período de luz, las células algales continuamente a una cantidad de luz que tiene una intensidad que corresponde o excede el nivel de luz de $1,5 \times E_k$ de dicha alga y que es mayor que en la etapa a.;
- 15 en el que el nivel de nitrógeno inorgánico está determinado y la etapa b,y la etapa c, se inician en un momento que ocurre durante una división celular antes y una división celular después del momento en que el nitrógeno inorgánico está por debajo del límite de detección en el medio de cultivo celular.
- 20 2. El método de la reivindicación 1 en el que se continúa la etapa c. durante al menos 3 h.
- 20 3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en donde se inicia la etapa b. cuando las células algales han alcanzado la fase de crecimiento estacionario.
- 25 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en donde las células algales se recogen 12 horas o más después de la inducción del agotamiento del nutriente.
- 25 5. El método de la reivindicación 1 en el que la cantidad de luz tiene una intensidad que corresponde o excede el nivel de luz de $2 \times E_k$ o de $3 \times E_k$ de dicha alga.
- 30 6. Un método para producir biocombustible renovable, que comprende
- 30 a. cultivar células algales de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para aumentar su proporción de lípidos neutros respecto a clorofila;
- 35 b. aislar los componentes lipídicos de las algas cultivadas; y
- 35 c. someter los componentes lipídicos aislados a reacciones químicas para generar hidrocarburos o alquilésteres de ácidos grasos,
- mediante lo cual se produce biocombustible renovable.

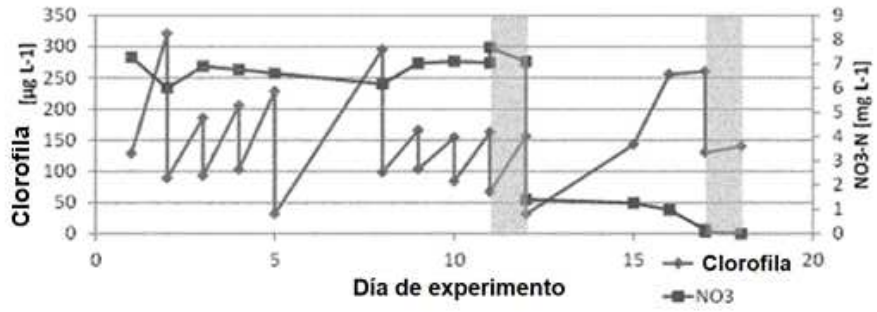


Fig. 1

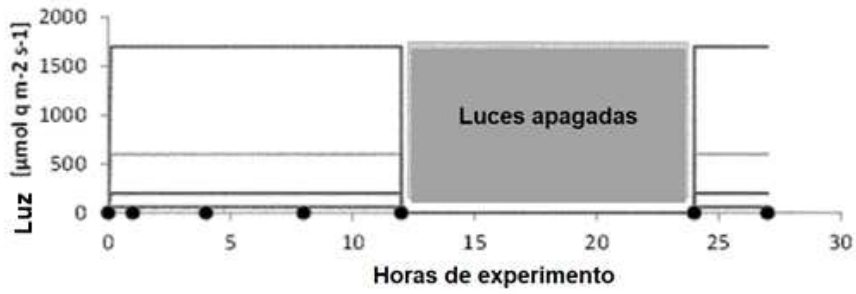


Fig. 2

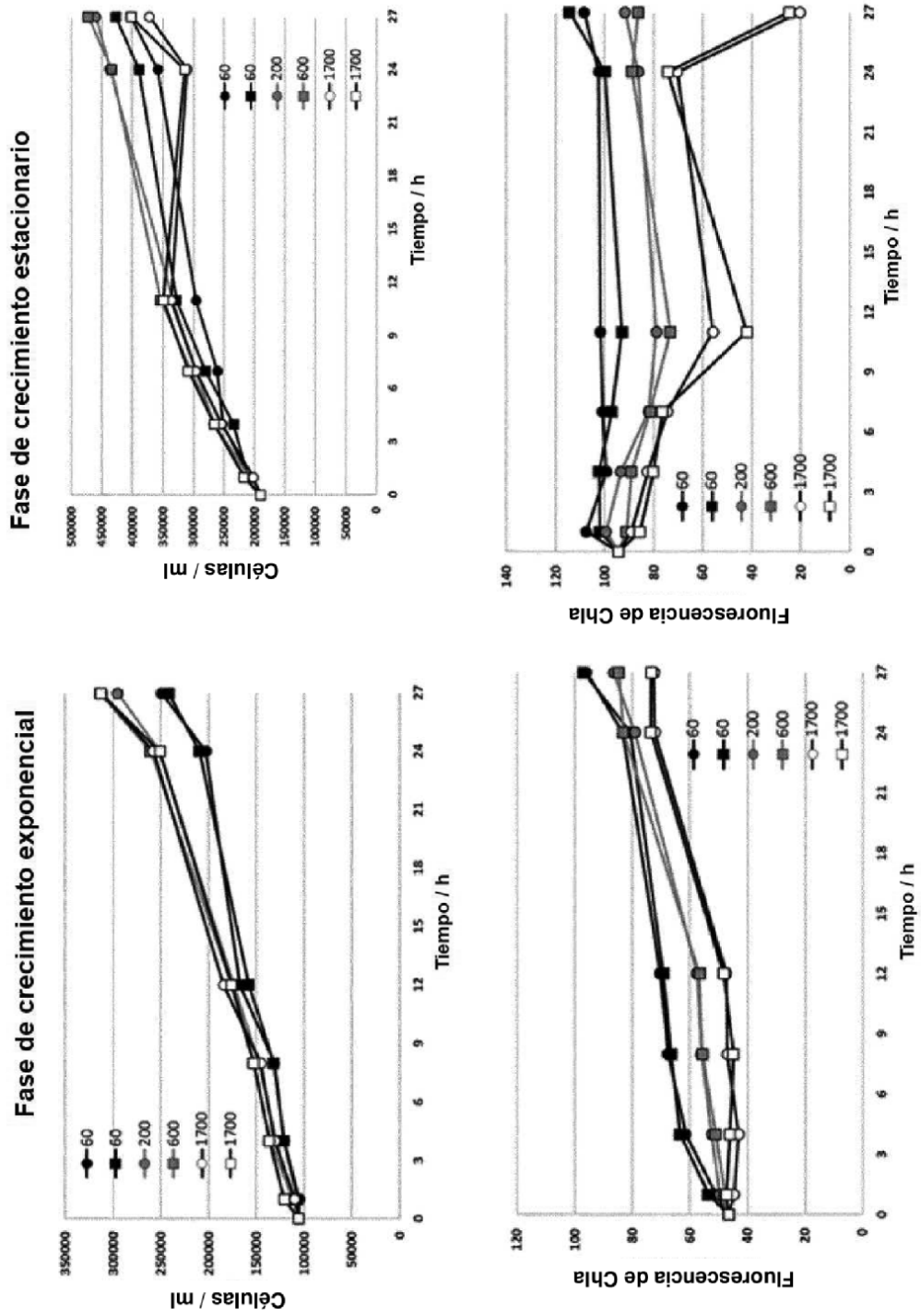


Fig. 3

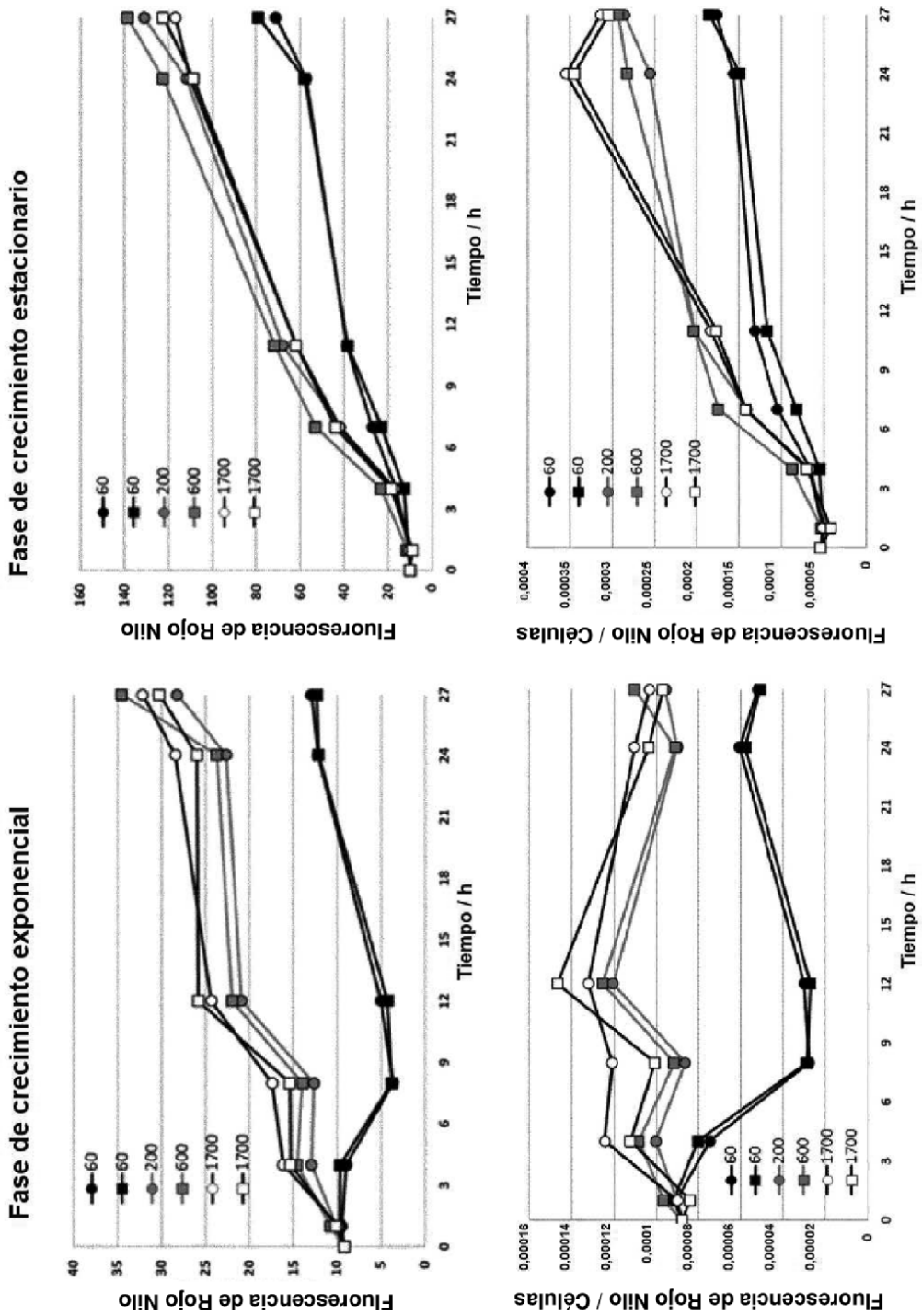


Fig. 3 (continuación)

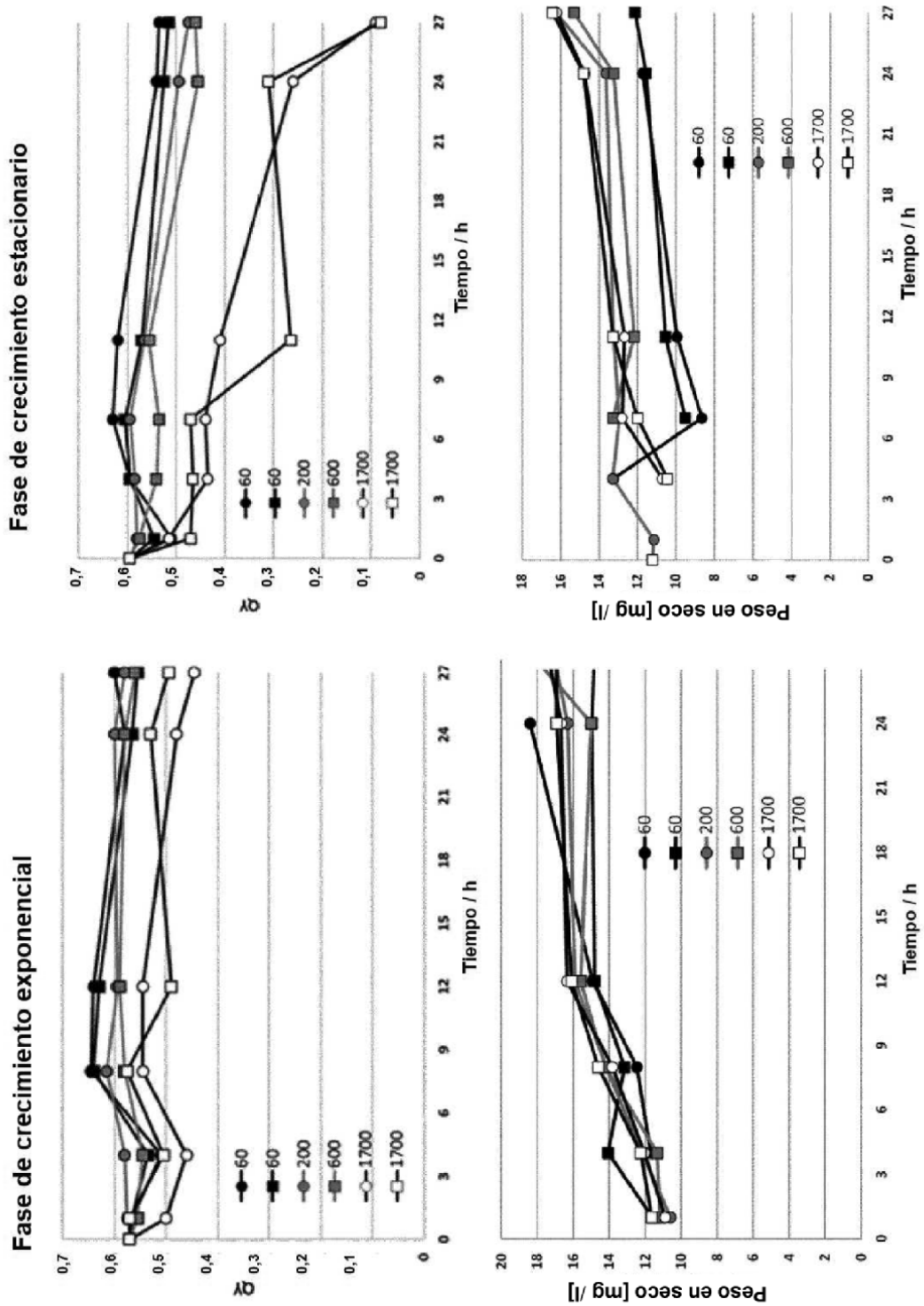
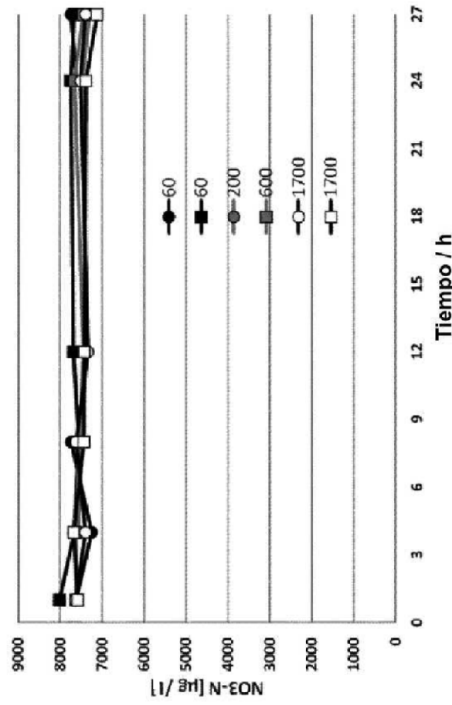


Fig. 3 (continuación)

Fase de crecimiento exponencial



Fase de crecimiento estacionario

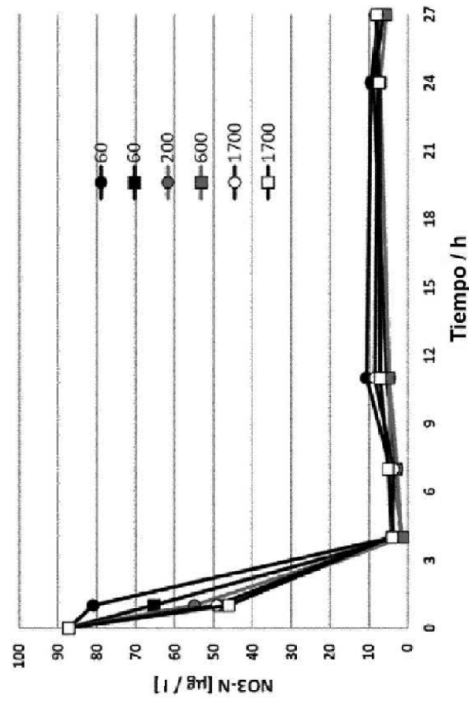
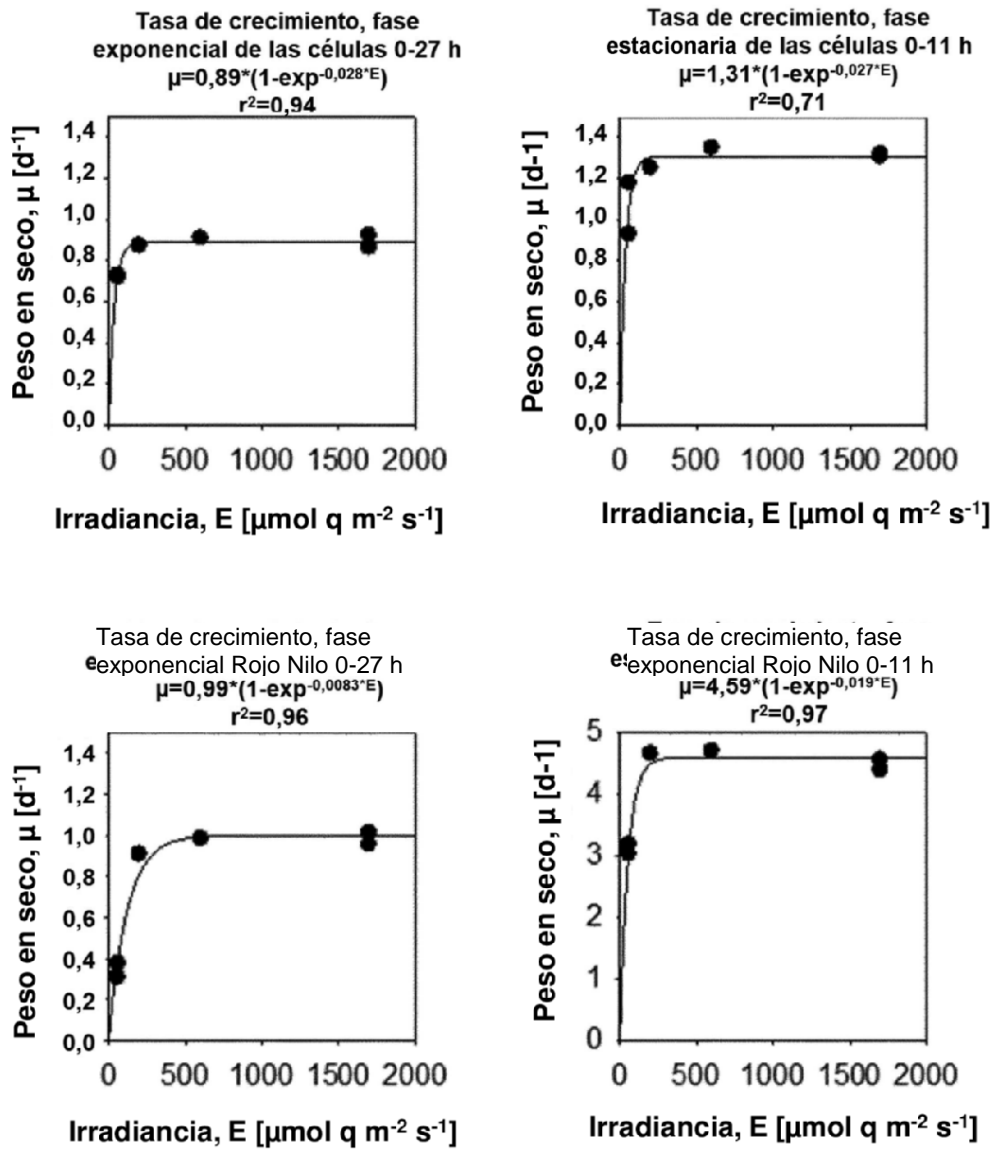


Fig. 3 (continuación)



$$\mu = \mu_{\max} (1 - \exp^{-1/K_e * E})$$

Fig. 4

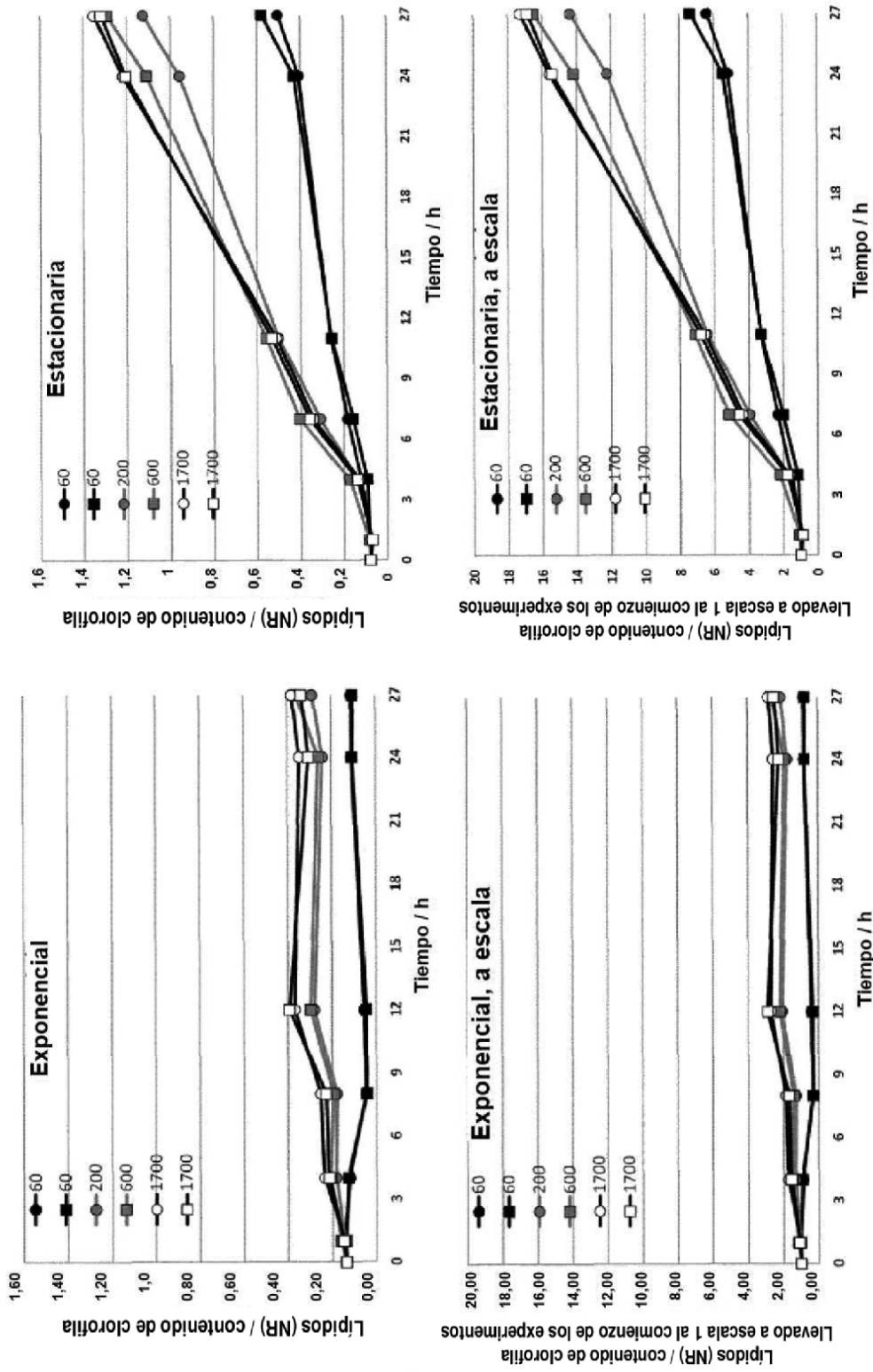
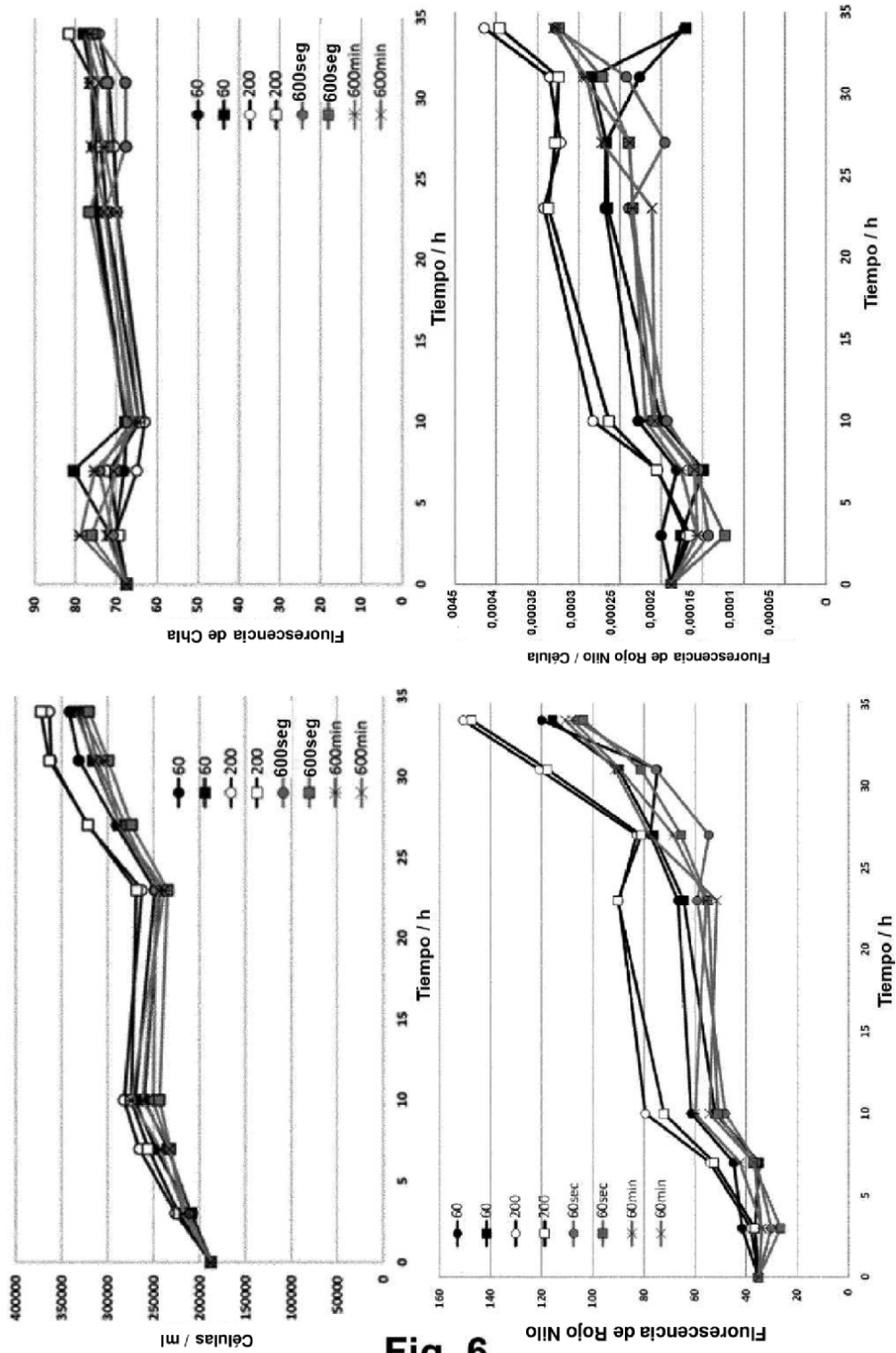


Fig. 5



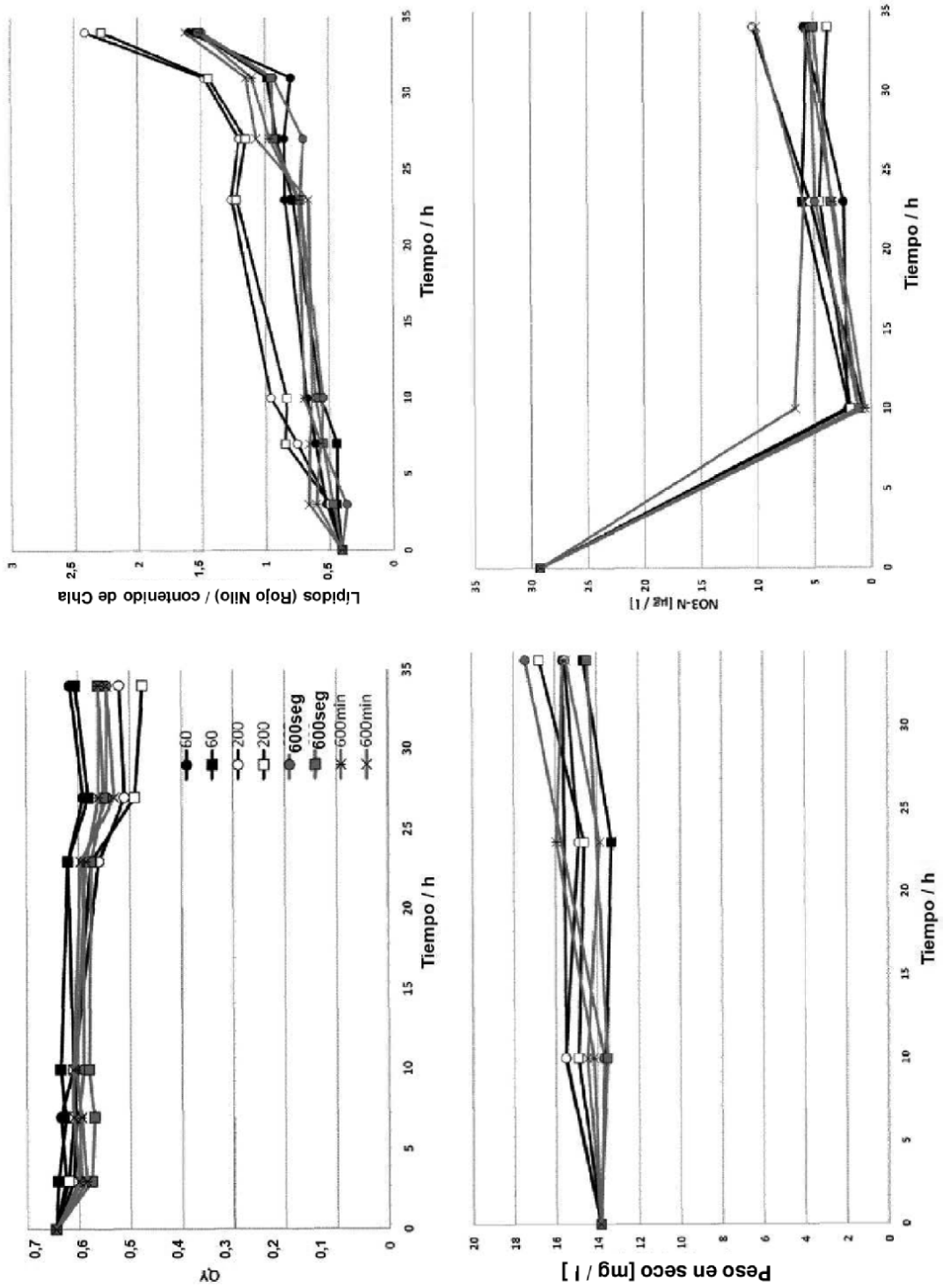


Fig. 6 (continuación)

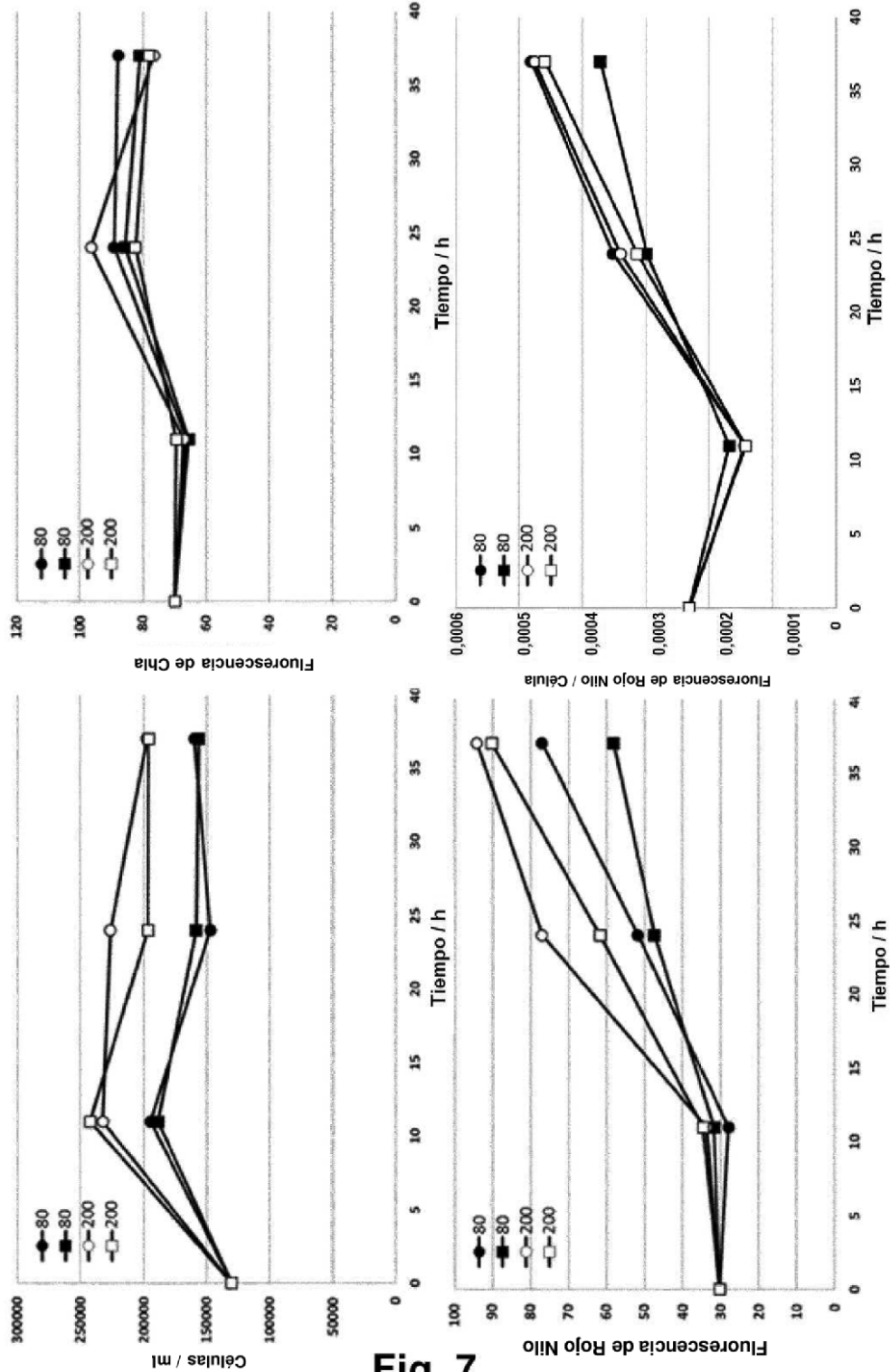


Fig. 7

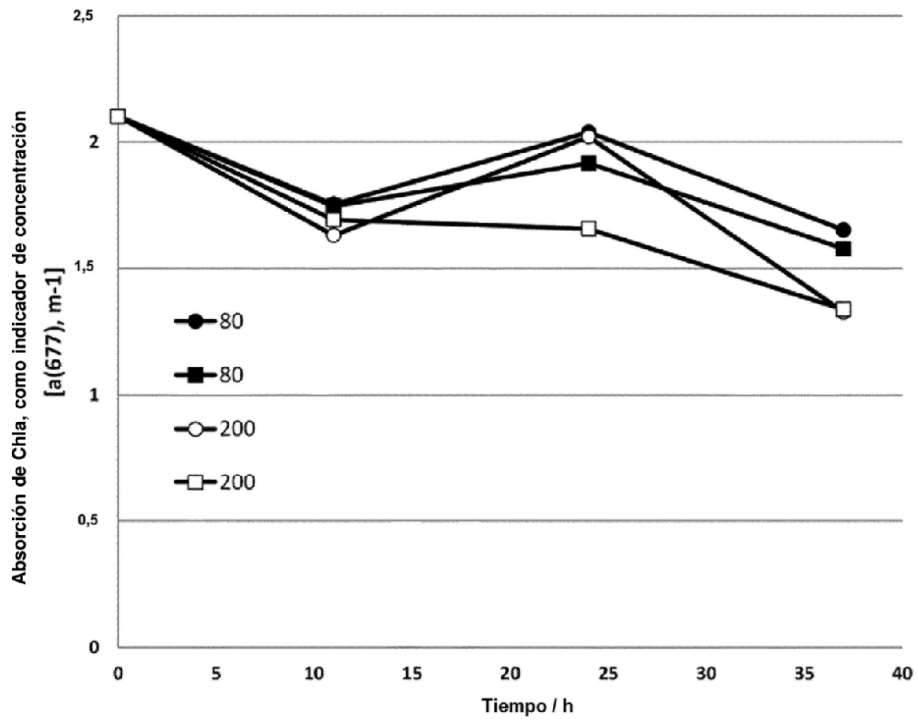


Fig. 7 (Continuación)

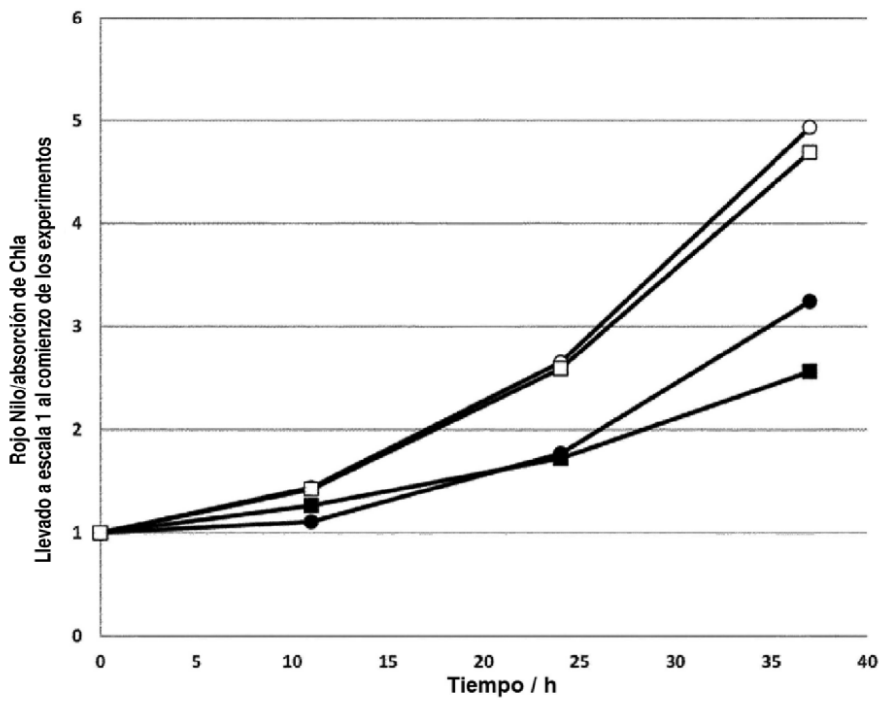
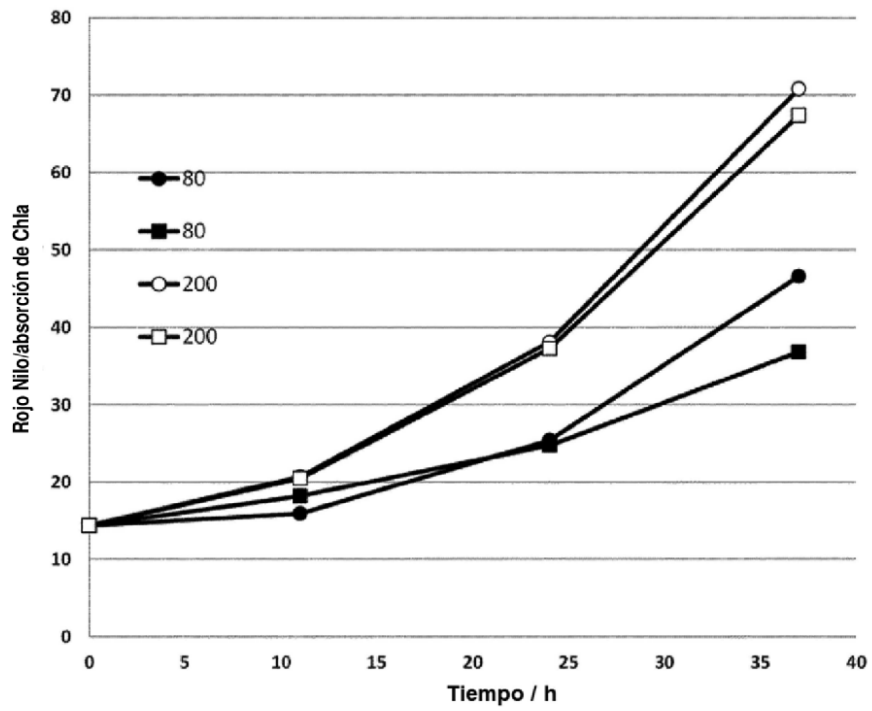


Fig. 8