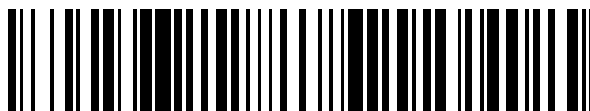


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 116**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/12** (2006.01)

**C12P 19/42** (2006.01)

**C12P 23/00** (2006.01)

**C12P 7/64** (2006.01)

**C12P 17/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2014 PCT/EP2014/056122**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14154785**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2014 E 14713106 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018 EP 2978836**

54 Título: **Procedimiento de estabilización de los metabolitos sensibles a la oxidación producidos por las microalgas del género Chlorella**

30 Prioridad:

**29.03.2013 FR 1352856**

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

**07.03.2019**

73 Titular/es:

**ROQUETTE FRÈRES (100.0%)  
1 rue de la Haute Loge  
62136 Lestrem, FR**

72 Inventor/es:

**MACQUART, GABRIEL**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 703 116 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de estabilización de los metabolitos sensibles a la oxidación producidos por las microalgas del género *Chlorella*

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de estabilización de los metabolitos sensibles a la oxidación producidos por microalgas, más particularmente del género *Chlorella*.

Los metabolitos sensibles a la oxidación más conocidos incluyen, por ejemplo, carotenoides.

Los carotenoides son pigmentos generalmente anaranjados o amarillos, que existen ampliamente en muchos organismos vivos. Al ser liposolubles, por lo general son fácilmente asimilados por los organismos.

10 Los carotenoides pertenecen a la familia química de los terpenoides, formados a partir de la polimerización de unidades isopreno con estructura alifática o alicíclica. Se asume generalmente que siguen vías metabólicas similares a las de los lípidos.

Son sintetizados por todas las plantas verdes y por muchos hongos, bacterias (de las cuales las cianobacterias) y por todas las microalgas.

Son absorbidos por los animales en sus alimentos.

15 Los carotenoides han sido estudiados para prevenir el cáncer y otras enfermedades de los seres humanos, dado que tienen propiedades antioxidantes notables.

Además, sus propiedades antioxidantes hacen que los carotenoides sean particularmente sensibles a la oxidación, dado que, como es bien conocido por los expertos en la técnica sabe, una sustancia antioxidante debe ser por sí sola fácilmente oxidable para cumplir esta función.

20 Ejemplos representativos de los carotenoides incluyen  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y licopeno.

El licopeno y el  $\beta$ -caroteno están presentes generalmente en una forma libre no combinada, que se encuentra en el interior de los cloroplastos de las células vegetales.

Las xantofilas son moléculas de un color amarillo derivadas de los carotenos mediante la adición de átomos de oxígeno (alcohol, cetona, epoxi y otras funciones). Pertenecen a la clase de carotenoides.

25 Las xantofilas están presentes en abundancia en un determinado número de frutos amarillos o anaranjados y hortalizas como melocotones, mangos, papayas, ciruelas, calabazas y naranjas.

También se encuentran en los cloroplastos o los cromoplastos de las células vegetales, particularmente en los pétalos de algunas flores de color amarillo, anaranjado o rojo y en las algas, por ejemplo, las algas pardas (Feoficeas), donde aquéllas enmascaran la clorofila.

30 Las xantofilas son antioxidantes que contribuyen, entre otras cosas, a la salud de los ojos.

Ejemplos de xantofilas comprenden luteína, astaxantina, cantaxantina, zeaxantina, criptoxantina, etc.

La forma libre de los carotenoides permite una mejor absorción cuando son consumidos en los alimentos o como complemento alimenticio.

35 La luteína es un pigmento de xantofila de fórmula 4[18-(4-hidroxi-2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)-3,7,12,16-tetrametiloctadeca-1,3,5,7,9,11,13,15,17-nonaen-1-il]-3,5,5-trimetilciclohex-2-en-1-ol que se encuentra en altas concentraciones en la mácula del ojo y en la parte central de la retina.

La misma tiene en ellas una función importante en la filtración de las longitudes de onda ultravioletas de la luz para evitar el deterioro del cristalino y la mácula.

40 Por otra parte, la luteína tiene propiedades antioxidantes que protegen también la mácula, que es rica en ácidos grasos poliinsaturados, de los radicales libres inducidos por la luz.

La luteína no puede ser producida por el cuerpo y, por consiguiente, debe ser aportada en la dieta.

Es por ello que la luteína se utiliza cada vez más en los complementos alimenticios para evitar y/o tratar las pérdidas de visión debidas a la degeneración macular ligada a la edad (o DMLA), las cataratas y la retinitis pigmentaria.

45 Las microalgas de tipo *Muriellopsis* sp., *Scenedesmus almeriensis*, *Chlorella zofingiensis*, *Chlorella sorokiniana* y *Chlorella protothecoides* han sido propuestas ya como fuentes potenciales de luteína.

Desde el punto de vista reglamentario, la luteína se obtiene mediante la extracción con disolvente de cepas de frutas y hortalizas comestibles, así como de hierbas, alfalfa y *Tagetes erecta*.

También pueden estar presentes diferentes cantidades de carotenos.

La luteína puede contener sustancias grasas y ceras presentes naturalmente en el material vegetal original.

- 5 Únicamente se permite la extracción con los siguientes disolventes: metanol, etanol, 2-propanol, hexano, acetona, metiletilcetona y dióxido de carbono.

Algunas preparaciones comerciales de luteína son vendidas como contenedoras de "5% o 10% de luteína". Estas preparaciones son, de hecho, luteína purificada (esterificada o libre) añadida a un estabilizador inerte en una proporción de 5% a 15% para conseguir su estabilización.

- 10 Dado que es sensible a la luz y a la oxidación, la misma debe almacenarse en un recipiente herméticamente cerrado, resistente a la luz y al oxígeno, en un sitio fresco y seco. A pesar de estas precauciones, no está totalmente garantizada la estabilidad de estos compuestos.

Además, estas condiciones de almacenamiento y manipulación no son tampoco fáciles de cumplir.

- 15 La luteína se encuentra en alta proporción en ciertas microalgas como *Chlorella*; por ello, es preferible seleccionar esta fuente microbiana a fin de desarrollar procesos de producción que permitan obtener además grandes cantidades de luteína de manera rentable y compensar la pérdida inherente a la labilidad de dichas moléculas.

- 20 Por otra parte, las microalgas del género *Chlorella* contienen una gama única de componentes que incluye, además de los carotenoides anteriormente mencionados, todos los aminoácidos esenciales, ácidos grasos saturados e insaturados, una gran cantidad de vitaminas, minerales, y oligoelementos, así como componentes valiosos, entre ellos clorofila, en una concentración alta.

Las microalgas son también una fuente nutricional potencialmente atractiva rica en proteínas y otros nutrientes esenciales; una vez secas, las mismas representan, clásicamente, un aporte de aproximadamente 45% de proteínas, 20% de sustancias grasas, 20% de carbohidratos, 5% de fibras y 10% de minerales y vitaminas.

- 25 Sin embargo, al igual que los carotenoides, los ácidos grasos insaturados presentan una sensibilidad tanto mayor a la oxidación cuanto mayor es su grado de insaturación; así, el ácido linoleico poliinsaturado es más sensible a la oxidación que los ácidos monoinsaturados de tipo oleico y palmítoleico.

Esto mismo es aplicable a los pigmentos clorofílicos, cuya sensibilidad a la foto-oxidación es bien conocida por los expertos en la técnica.

- 30 Así, se sabe que las sales solubles de clorofila tienen una actividad antioxidante más de 1000 veces mayor que la de las xantinas, y 20 veces mayor que la del resveratrol (un polifenol de la clase de los estilbenos presente en algunas frutas como uvas, moras, etc.)

Los suplementos de clorofila se encuentran así comercializados en forma líquida, como comprimidos o cápsulas. La clorofila se incluye a menudo en las fórmulas de alimentos verdes en polvo.

- 35 Respecto a las vitaminas, las vitaminas B hidrosolubles (vitamina B9 o vitamina B12, por ejemplo) son naturalmente lábiles (sensibles a la luz, al calor y a la oxidación).

La importancia de las vitaminas A, C y E como antioxidantes en la bioquímica de los organismos vivos está también bien documentada.

Para aumentar la resistencia de todos estos elementos nutrientes, es por tanto necesario protegerlos contra las "agresiones del exterior", es decir, luz y oxígeno.

- 40 Ahora bien, las vías clásicas para preparar estos compuestos pasan por su extracción / purificación a partir de su medio biológico básico, y posteriormente, seguida por su confinamiento en recipientes herméticamente cerrados.

Se recomiendan por tanto aditivos antioxidantes y condiciones de almacenamiento en atmósfera inerte. Sin embargo, aparte que estas tecnologías son complejas y costosas de implementar, las mismas no son muy eficaces ni totalmente satisfactorias desde el punto de vista de la nutrición y la salud.

- 45 Se ha presentado una solución técnica alternativa, particularmente en la patente de Estados Unidos 2005/0186298, constituido por estabilizar los carotenoides en la biomasa de las microalgas que los producen.

En este caso, se trata más particularmente de una cuestión de estabilización de la biomasa de *Haemotococcus pluvialis*, que produce astaxantina.

Sin embargo, esta solución técnica recomienda:

- producir la biomasa seca (clásicamente en condiciones fototróficas - crecimiento en presencia de luz y CO<sub>2</sub> - pero que puede producirse igualmente en heterotrofia - fermentación en la oscuridad en presencia de una fuente carbonada asimilable), y a continuación

5 - combinar esta biomasa con una mezcla de al menos

dos antioxidantes de tipo tocoferol.

Por consiguiente, el problema subyacente de la presente invención es proponer un procedimiento alternativo de estabilización de los metabolitos sensibles a la oxidación, y más particularmente los producidos por microalgas, particularmente las del género *Chlorella*, mediante un procedimiento simple, sin necesidad de añadir sustancias químicas como antioxidantes o estabilizadores.

10

Preocupada por la puesta a punto de un procedimiento que sea más eficaz que los conocidos en la técnica anterior, la sociedad Solicitante ha realizado sus propias investigaciones y ha alcanzado éxito en la adaptación de las tecnologías de producción de las microalgas en heterotrofia para llegar a este objetivo.

15

El cultivo de las clorofitas y más particularmente de *Chlorella*, por vía heterotrófica es conocido de manera general para la preparación de biomasa rica en metabolitos de interés, entre ellos la luteína.

Así, se ha admitido desde los años 1960 que es incluso posible obtener rendimientos mucho mayores de pigmentos que con las mismas microalgas cultivadas más clásicamente en condiciones auxotróficas en presencia de luz.

La elección de esta vía de producción heterotrófica, como se ha indicado anteriormente, tiene sobre todo como objetivo producir los mayores contenidos de luteína posibles, compensando así la pérdida por degradación oxidante.

20

Shi et al (2002, *Biotechnology Progress*, American Institute of Chemical Engineers, vol 18, 723-727) describe la producción de luteína por cultivo fermentativo heterotrófico en modo discontinuo por microalgas del género *Chlorella protothecoides*. Sansawa et al (2004, *J. Bioscience and Bioengineering*, 98, 437-444), Doucha et al (2012, *J. Applied Phycology*, 24, 35-43) y Wang et al (2008, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 1915-1922) describen procedimientos de fermentación de una biomasa de microalgas del género *Chlorella* que comprende una fase de cultivo deficiente en glucosa. Wu et al, en su artículo de 2007 publicado en la revista *World J. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 23, pp 1233-1238, han modelizado así la producción de luteína por cultivo fermentativo heterotrófico en modo discontinuo (tipo "batch") y semicontinuo (tipo "fed-batch") a fin de optimizar la producción de luteína. US2010/0303989 divulga un procedimiento de producción de aceite por *Chlorella protothecoides* que comprende la fermentación de *Chlorella* en condiciones heterotróficas que comprenden una etapa de fermentación en modo "fed-batch". La concentración de glucosa se ha vigilado. Cuando la concentración de glucosa era baja, se añadía más glucosa al fermentador.

25

30

Sin embargo, conforme al conocimiento de la sociedad Solicitante, ninguno de los documentos de la técnica anterior describe o sugiere la utilización de la biomasa en sí misma, producida en condiciones heterotróficas, como vector de estabilización de los metabolitos de interés.

Por el contrario, se recomienda añadir antioxidantes para alcanzar este resultado.

35

La presente invención se basa en un procedimiento tal como se describe en las reivindicaciones.

La presente descripción describe un procedimiento de estabilización o almacenamiento de metabolitos sensibles a la oxidación seleccionados del grupo constituido por carotenoides como la luteína, ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados como el ácido palmitoleico, el ácido oleico o el ácido linoleico, pigmentos clorofílicos como clorofila A y B, y vitaminas como las vitaminas B9 y B12, tomadas solas o en combinación, más particularmente carotenoides, comprendiendo dicho procedimiento:

40

- fermentar una biomasa de microalgas en condiciones heterotróficas, que comprenden una fase de cultivo deficiente en un factor nutritivo; y
- almacenar la biomasa seca en cuyo seno los metabolitos sensibles a la oxidación están estabilizados.

45

Por "estabilización de los metabolitos" se entiende garantizar la calidad de los metabolitos de interés después de su almacenamiento durante un periodo mayor que un año, lo cual se traduce particularmente en la protección de los metabolitos contra la degradación oxidante. En particular, el almacenamiento se puede realizar a la temperatura ambiente en una atmósfera no inerte. La etapa de almacenamiento dura al menos 12, 18 ó 24 meses, preferentemente a la temperatura ambiente.

50

Por "metabolitos de interés sensibles a la oxidación" producidos por las microalgas del género *Chlorella*, se entienden compuestos seleccionados del grupo constituido por carotenoides que incluyen luteína, ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados, que incluyen ácido palmitoleico, ácido oleico y ácido linoleico, pigmentos

clorofílicos como clorofila A y B, y vitaminas, que incluyen la vitamina B9 y particularmente la vitamina B12, más particularmente, carotenoides.

5 Por fase de cultivo "deficiente en un factor nutritivo" se entiende una fase de cultivo en la cual al menos uno de los factores nutritivos de la microalga es aportado en una cantidad que es insuficiente para permitir su crecimiento normal. Debe tenerse en cuenta que "cantidad insuficiente" no se entiende como un aporte nulo de este factor nutritivo. Esta fase deficiente de nutriente da como resultado la ralentización (limitación) del metabolismo celular, sin inhibirlo completamente.

El cultivo se realiza, por ejemplo, en condiciones tales que uno de los factores nutritivos es aportado al medio a una velocidad inferior a la velocidad de consumo que la microalga podría alcanzar sin limitación.

10 Esto se traduce también en la ausencia de un factor nutritivo residual en el medio de cultivo, dado que la microalga consume este factor nutritivo a medida en que es aportado.

Preferentemente, el factor nutritivo es la fuente carbonada y más particularmente, la glucosa.

La presente invención es particularmente adecuada por tanto para la estabilización de metabolitos tales como los carotenoides, cuya sensibilidad extrema a la oxidación es conocida por los expertos en la técnica.

15 En el contexto más particular de la invención, la estabilización de los carotenoides garantiza así la estabilización de los otros metabolitos producidos por las microalgas, donde dichos metabolitos son susceptibles de degradación por oxidación.

Más particularmente, los metabolitos sensibles a la oxidación son almacenados en las células de las microalgas contenidas en la biomasa.

20 El procedimiento conforme a la presente invención hace innecesaria la adición de un antioxidante o estabilizador exógeno para preservar los metabolitos sensibles a la oxidación. Por tanto, preferentemente, el procedimiento no comprende añadir un antioxidante o estabilizador exógeno a dicha biomasa seca.

La invención proporciona una biomasa natural con un contenido garantizado de metabolitos de interés, como los pigmentos.

25 En la presente descripción, la biomasa de microalgas se entiende como biomasa de microalgas, más particularmente del género *Chlorella*, como por ejemplo *Chlorella sorokiniana*. En un modo muy particular, la cepa *Chlorella sorokiniana* es la cepa UTEX 1663 (*La Colección de Cultivos de Algas en la Universidad de Texas en Austin, EE.UU.*).

30 Más particularmente, los metabolitos de interés a estabilizar se entenderán aquí, como se ilustrará en los ejemplos dados en esta descripción, como carotenoides totales, que incluyen la luteína, las clorofilas y las vitaminas. En una realización preferida, el metabolito de interés a estabilizar es la luteína.

La vitamina B12, que no es producida naturalmente por la microalga cuando se cultiva en heterotrofia, se añade al medio de cultivo y asimilada por ésta.

35 En una realización preferida del procedimiento, la fermentación se realiza en condiciones particulares de cultivo heterotrófico, que garantizan una eficiencia óptima respecto de la estabilización de los metabolitos de interés sensibles a la degradación oxidante producidos por las microalgas.

Por tanto, el procedimiento comprende fermentar una biomasa de microalgas en condiciones heterotróficas con una primera etapa de crecimiento de la biomasa y con una segunda etapa de cultivo deficiente en un factor nutritivo.

La producción de biomasa comprende así:

- una primera etapa de fermentación en modo "batch",
- 40 • una segunda etapa de fermentación en modo "fed-batch" que se traduce, cuando la microalga consume la fuente carbonada por completo, por el aporte continuo de dicha fuente carbonada a una velocidad inferior a la velocidad de consumo que la microalga podría alcanzar sin limitación.

45 La sociedad Solicitante recomienda realizar, antes de la fase de producción de la biomasa, una primera fase de precultivo (por fermentación en modo discontinuo), que permite luego la producción de una cantidad de biomasa de microalgas necesaria para la siembra de los fermentadores de producción propiamente dichos.

Por ejemplo, si se elige cultivar una cepa de *Chlorella* como, por ejemplo, *Chlorella sorokiniana*, se obtiene después de esta primera fase de precultivo una densidad celular (medida clásicamente por densidad óptica a 600 nm) de valor comprendido entre 50 y 60 como se mostrará en los ejemplos dados a continuación.

Respecto de la producción de la biomasa de las microalgas, la misma comprende por tanto una primera etapa de fermentación en modo "batch", con un medio de cultivo idéntico por ejemplo al empleado en la etapa de precultivo.

5 Cuando se produce un consumo completo de la fuente carbonada por parte de la microalga (en este caso, glucosa residual en el medio de cultivo = 0 g/l), dicha fuente carbonada se añade continuamente a una velocidad menor a la velocidad de consumo por la microalga. En una realización preferida, el factor nutritivo deficiente es glucosa.

La sociedad Solicitante ha vencido un prejuicio técnico, dado que está admitido comúnmente que para optimizar la producción de luteína por *Chlorella* (artículo de Wu et al., citado anteriormente), si la alta concentración de glucosa inhibe el crecimiento y la producción de luteína, se recomienda dar preferencia a una concentración mínima de glucosa, comprendida entre 5 y 24 g/l en el caso de la producción de luteína por la cepa *C. pyrenoidosa*.

10 Por tanto, las condiciones de cultivo recomendadas conforme a la invención no son compatibles con las admitidas comúnmente en la técnica anterior para la optimización de la producción de luteína.

15 En el caso de *Chlorella sorokiniana*, la sociedad Solicitante recomienda añadir glucosa a una velocidad superior a 1 g/l/h, manteniendo la glucosa residual en 0 g/l. Por ejemplo, la velocidad de aporte de glucosa puede oscilar entre 1 y 5 g/l/h, más particularmente entre 2 y 4 g/l/h. Esta velocidad se selecciona de tal modo que la glucosa residual en el medio de cultivo es 0 g/l. Esta velocidad puede definirse sobre la base de la velocidad de consumo de glucosa en ausencia de limitación. Por tanto, la velocidad de aporte de glucosa puede ser 90, 80, 70, 60 ó 50% de esta velocidad de consumo de glucosa en ausencia de limitación.

Esta velocidad se sitúa así en aproximadamente 2 g/l/h al comienzo de la operación "fed-batch", y la misma puede aumentar hasta 4 g/l/h al final del cultivo.

20 La velocidad de aporte del factor nutritivo deficiente se selecciona preferentemente de tal modo que disminuye o ralentiza la velocidad de crecimiento celular, mientras se mantiene el crecimiento a una velocidad distinta de cero. En particular, se propone disminuir la velocidad de crecimiento entre 10% y 60% con relación a la velocidad de crecimiento sin limitación de glucosa, específicamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 ó 55% con relación a la velocidad de crecimiento sin limitación de glucosa. Preferentemente, la velocidad de crecimiento se reduce de 15% a 55%.

25 Por ejemplo, para la cepa de *Chlorella sorokiniana*, la sociedad Solicitante recomienda seleccionar una velocidad de aporte de glucosa que permite un crecimiento  $\mu$  de al menos 0,04 h<sup>-1</sup>, comprendido por ejemplo entre 0,06 h<sup>-1</sup> y 0,09 h<sup>-1</sup>.

Por tanto, la velocidad de aporte del factor nutritivo es tal que permite un crecimiento celular  $\mu$  de al menos 0,04 h<sup>-1</sup>, por ejemplo, entre 0,06 h<sup>-1</sup> y 0,09 h<sup>-1</sup>.

30 La duración de la fase de cultivo deficiente en factor nutritivo, particularmente glucosa, es de al menos 1 hora, preferentemente de al menos 10 horas, más preferentemente de al menos 20 horas, en particular entre 30 horas y 60 horas.

La fermentación se para (se detiene el aporte de glucosa) cuando se alcanza la cantidad deseada de biomasa (por ejemplo, entre 30 y 80 g/l).

35 Se ha realizado un estudio de estabilidad (durante 14 meses y 23 meses) orientado a estudiar la evolución del contenido de carotenoides (luteína), vitaminas (B9 y más particularmente B12) y ácidos grasos totales de la biomasa obtenida por fermentación en condiciones heterotróficas, en comparación con una biomasa producida en condiciones fototróficas.

40 Como se mostrará más adelante en los ejemplos, se constata una estabilidad mucho mejor de los metabolitos producidos por *Chlorella* la cuando la biomasa se prepara en condiciones heterotróficas conforme a el procedimiento preferido de la invención.

Así, por ejemplo, la biomasa obtenida en fotobiorreactor ha perdido prácticamente un 80% de su concentración de luteína después de 14 meses de almacenamiento, mientras que la de la biomasa preparada en condiciones heterotróficas se mantiene inalterada.

45 La presente invención describe también la utilización de una biomasa de microalgas producida en condiciones heterotróficas que comprende una fase de cultivo deficiente en un factor nutritivo de estabilización de sus metabolitos sensibles a la oxidación. Preferentemente, las microalgas se seleccionan del grupo de microalgas del género *Chlorella*, más particularmente *Chlorella sorokiniana*. Preferentemente, el factor nutritivo limitante es la fuente carbonada y más particularmente, glucosa.

50 La presente descripción describe también una biomasa de microalgas del género *Chlorella*, más particularmente *Chlorella sorokiniana*, obtenida por el procedimiento conforme a la presente invención, caracterizado por que la misma contiene al menos 1 g de luteína por kg de biomasa después de almacenamiento durante al menos 12, 18 ó 24 meses a la temperatura ambiente sin añadir un antioxidante o estabilizador exógeno a dicha biomasa seca.

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

**Ejemplos**

**Ejemplo 1: Preparación de la biomasa de *C. Sorokiniana* cultivada en condiciones heterotróficas conforme al modo preferido de la invención**

5 **Fase 1. Precultivo**

El precultivo permite la reactivación de las cepas y la inoculación del fermentador de producción.

La operación se realiza en matraces Erlenmeyer a partir de un tubo congelado de cepa de *Chlorella sorokiniana* (cepa UTEX 1663 - *La Colección de Cultivos de Algas en la Universidad de Texas en Austin, EE.UU.*) y con 600 ml del medio de la composición tal como se presenta en la Tabla 1 a continuación:

10 Tabla 1.

Macroelementos (g/L)	Glucosa	20
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	0,7
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,34
	Acido cítrico	1,0
	Urea	1,08
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,2
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,1
	Extracto de levaduras	1
	clerol FBA 3107 (antiespumante)	0,5
Microelementos (mg/L)	Na <sub>2</sub> EDTA	10
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	80
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	40
	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,41
	CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,24
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,24
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,11
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>27</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,04

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

La incubación se produce a 28°C ± 1°C con agitación a 110 rpm (agitador Multitron de INFORS) durante 72 horas.

15 La concentración final de biomasa obtenida al final de la incubación de cada matraz Erlenmeyer, por medida de la DO a 600nm, se sitúa en aproximadamente 50-60.

**Fase 2. Producción**

Los parámetros para realizar la fermentación aparecen en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2.

Volumen	13,5 L Después de la Inoculación - 16 a 20 L al final
Temperatura	28-30°C
pH	6,5-6,6 con NH <sub>3</sub> al 28% p/p
pO <sub>2</sub>	>20% (mantenida por agitación)

Agitación	300 rpm
Caudal de aire	15 L/min

**Etapa 1: fermentación en modo "Batch"**

El medio del lote es idéntico al medio para precultivo (Tabla 1) pero sin el extracto de levadura y la urea se reemplaza por NH<sub>4</sub>Cl (Tabla 3 a continuación).

5

Tabla 3.

Macroelementos (g/L)	Glucosa	20
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	0,7
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,34
	Ácido cítrico	1,0
	NH <sub>4</sub> Cl	1,88
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,2
	clerol FBA 3107 (agente antiespumante)	0,5
Microelementos (mg/L)	Na <sub>2</sub> EDTA	10
	CaCl <sub>2</sub>	80
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	40
	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,41
	CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,24
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,24
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,11
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>27</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,04

**Paso 2: fermentación en modo "fed-batch"**

10 Se añade igualmente vitamina B12 en la fase de lote, a razón de 0,47 µg/l de medio, de manera que la misma sea almacenada en la biomasa con un valor del orden de 400 µg / 100 g de biomasa seca.

En la fase de "fed-batch", el aporte del medio completo se realiza con una alimentación de glucosa en régimen continuo a una velocidad inferior a la velocidad de consumo permitida por la cepa de tal modo que el contenido residual en el medio es nulo.

15 Esta velocidad de aporte de glucosa es aproximadamente 2 g/L<sub>AI</sub>/h (AI = después de la inoculación) al comienzo de la operación "fed-batch" y puede aumentar hasta 4 g/L<sub>AI</sub>/h al final del cultivo. El crecimiento µ durante esta etapa oscila entre 0,07 y 0,08 h<sup>-1</sup>.

La concentración de glucosa en la solución de alimentación puede oscilar entre 400 y 800 g/L.

Las sales se aportan continuamente, por separado o mezcladas con glucosa.

20 La primera adición debe hacerse una vez que ha finalizado operación "batch", pero las sales no deben aportarse de una vez para evitar la inhibición del crecimiento de la cepa.

La tabla 4 siguiente da los requerimientos de sales para 100 g de glucosa:



Tabla 4.

Macroelementos (g)	Glucosa	100
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ,3H <sub>2</sub> O	6,75
	MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	1,7
	Ácido cítrico	5,0
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0
Microelementos (mg)	Na <sub>2</sub> EDTA	50
	CaCl <sub>2</sub> ,2H <sub>2</sub> O	400
	FeSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	200
	MnSO <sub>4</sub> ,4H <sub>2</sub> O	2,1
	CoSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	1,2
	CuSO <sub>4</sub> ,5H <sub>2</sub> O	1,2
	ZnSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	2,5
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,6
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>8</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>27</sub> ,4H <sub>2</sub> O	0,2

La adición de glucosa se detiene cuando la densidad celular alcanza 80 g/l. Ello detiene el cultivo.

La biomasa se atomiza con una materia seca > 95%.

5 **Ejemplo 2: Estudios de estabilidad a la temperatura ambiente de los metabolitos sensibles a la oxidación producidos por *Chlorella sorokiniana***

Se ha realizado un estudio de estabilidad durante un período de 14 y 23 meses a la temperatura ambiente, orientado a estudiar la evolución del contenido de carotenoides, luteína, vitamina B9 y más particularmente vitamina B12, extraídos de las biomásas obtenidas en heterotrofia (por fermentación) o en autotrofia (fotobiorreactores).

10 Este estudio permite demostrar el impacto del procedimiento del cultivo de las Chlorellas sobre la estabilidad de estos metabolitos sensibles a la oxidación.

Se comparan dos biomásas:

- la primera, producida conforme a las condiciones del ejemplo 1,
- la segunda, producida en fotobiorreactor (como el PBR 4000), en condiciones convencionales (Pulz et al., 2000, en Rehm H.-J., Reed G. (Eds), Biotechnology, Vol. 10, Segunda edición, Weinheim, 105-136).

15 Las mediciones se realizan sobre 100 g de biomasa a más de 95% de MS (materia seca), producidos en estas dos condiciones operatorias.

**Evolución del contenido de carotenoides totales y de luteína (dosificaciones realizadas por HPLC)**

	Biomasa producida por fermentación			Biomasa producida en fotobiorreactor		
	t = 0	t = 14 meses	t = 23 meses	t = 0	t = 14 meses	t = 23 meses
Luteína (mg /kg)	2100	1950	1475	2650	525	375
Carotenoides totales (g / 100g)	0,49	0,32	0,27	0,51	0,17	0,14

La estabilidad de los carotenoides totales es mayor en la biomasa obtenida en heterotrofia.

Se observa la misma tendencia para la luteína; la biomasa fermentada proporciona una mejor protección de la luteína contra la degradación.

5 **Evolución del contenido de vitaminas (dosificaciones realizados conforme a los procedimientos AOAC 952.20 - Vitamina B12)**

La vitamina B12, aportada por el medio de cultivo en heterotrofia, era bien asimilada por la biomasa de *Chlorella sorokiniana*; en este caso, su contenido es del orden de 363 µg por 100 g de biomasa seca.

	Biomasa producida por fermentación			Biomasa producida en fotobiorreactor		
	t = 0	t = 14 meses	t = 23 meses	t = 0	t = 14 meses	t = 23 meses
Vitamina B12 (µg / 100 g)	363	304	nd	120	107	nd
<i>Nd significa no determinado.</i>						

10

Se observa estabilidad de la vitamina B12 durante todo el estudio en ambos casos. Los valores varían alrededor de 300µg/100g para la biomasa producida en heterotrofia y alrededor de 105µg/1400g para la biomasa producida en autotrofia.

**Evolución del contenido de Clorofilas (dosificaciones realizadas por espectrofotometría)**

15

	Biomasa producida por fermentación			Biomasa producida en fotobiorreactor		
	t = 0	t = 14 meses	t = 23 meses	t = 0	t = 14 meses	t = 23 meses
Clorofila A (g / 100 g)	2,21	1,7	1,48	2,33	1,32	1,07
Clorofila B (g / 100 g)	0,55	0,51	0,5	0,57	0,57	0,53

El contenido de Clorofila B se mantiene estable en ambas condiciones operativas, pero esto no sucede para el contenido de clorofila A, que está estabilizada mucho mejor en la biomasa producida por fermentación.

20 En conclusión, los metabolitos producidos por las microalgas son más estables en la biomasa producida por fermentación (lo cual refleja su mejor protección contra la degradación oxidante, a la cual son sensibles aquéllos).

Este fenómeno es aún más pronunciado para el contenido de luteína, notablemente más estable en la biomasa fermentada (en tanto que es degradada en más de 80% en la biomasa producida en autotrofia).

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de estabilización o almacenamiento de metabolitos sensibles a la oxidación seleccionados del grupo constituido por carotenoides como la luteína, ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados como el ácido palmitoleico, el ácido oleico o el ácido linoleico, pigmentos clorofílicos como las Clorofilas A y B, y vitaminas como las vitaminas B9 y B12, tomados solos o en combinación, más particularmente carotenoides, comprendiendo dicho procedimiento:
- 5
- la fermentación de una biomasa de microalgas en condiciones heterotróficas que comprende:
    - una primera etapa de fermentación en modo "batch"
    - una segunda etapa de fermentación en modo "fed batch" que comienza cuando la fuente carbonada es consumida totalmente por la microalga, por aporte en continuo de dicha fuente carbonada a una velocidad inferior a su velocidad de consumo por la microalga; y
  - el almacenamiento de la biomasa seca en el seno de la cual se estabilizan los metabolitos sensibles a la oxidación.
- 10
2. Procedimiento conforme a la reivindicación 1, **caracterizado por que** las microalgas se seleccionan del grupo de las microalgas del género *Chlorella*, más particularmente *Chlorella sorokiniana*.
- 15
3. Procedimiento conforme a una u otra de las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado por que** el procedimiento no comprende la adición de un antioxidante o estabilizador exógeno a dicha biomasa seca.
4. Procedimiento conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, **caracterizado por que** el factor nutritivo deficiente es glucosa y por que el mismo es aportado al cultivo a una velocidad superior a 1 g/l/h, preferentemente a una velocidad comprendida entre 1 y 5 g/l/h, más particularmente entre 2 y 4 g/l/h.
- 20
5. Procedimiento conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, **caracterizado por que** la duración de la fase de cultivo deficiente es de al menos 1 horas, preferentemente de al menos 10 horas, más preferentemente de al menos 20 horas, y particularmente entre 30 y 60 horas.
6. Procedimiento conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, **caracterizado por que** la etapa de almacenamiento dura al menos 12, 18 ó 24 meses a la temperatura ambiente.
- 25
7. Procedimiento conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, **caracterizado por que** el metabolito sensible a la oxidación es la luteína.