

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 903**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 1/12</b>	(2006.01)
<b>C12N 1/14</b>	(2006.01)
<b>C12N 1/20</b>	(2006.01)
<b>C12N 13/00</b>	(2006.01)
<b>C12P 7/64</b>	(2006.01)
<b>C12P 23/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.07.2014 PCT/FR2014/051809**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.01.2015 WO15004403**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2014 E 14747100 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 3019593**

54 Título: **Procedimiento de cultivo celular desacoplado**

30 Prioridad:

**12.07.2013 FR 1356918**

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

**20.03.2019**

73 Titular/es:

**FERMENTALG (100.0%)  
4 rue Rivière  
33500 Libourne, FR**

72 Inventor/es:

**GARNIER, PATRICE;  
PAGLIARDINI, JULIEN y  
CALLEJA, PIERRE**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 704 903 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 cultivo celular desacoplado

5 La invención se refiere a un procedimiento de producción de biomasa mediante el cultivo celular en condiciones de mixotrofia, en particular en presencia de una iluminación discontinua y/o variable de luz, y/o en condiciones de heterotrofia que permiten obtener a la vez un aumento de la concentración de células y de la producción de moléculas de interés.

10 El procedimiento de producción de biomasa según la invención comprende el cultivo de células en modo continuo en condiciones de mixotrofia o en condiciones de heterotrofia en un fermentador, y luego la alimentación en continuo de los fermentadores que funcionan en modo semicontinuo con las células producidas y su cultivo en condiciones de mixotrofia o en condiciones de heterotrofia en dichos fermentadores.

15 El procedimiento es aplicable a las células y, en particular, a los organismos unicelulares eucariotas o procariotas. Este procedimiento es, en particular, aplicable a las células fotosensibles, es decir, capaces de inducir una actividad metabólica en respuesta a una iluminación natural o artificial, en las condiciones de mixotrofia, en particular de los protistas. El procedimiento permite obtener a la vez una elevada concentración de biomasa y un enriquecimiento de las moléculas de interés en las células así cultivadas, sobre todo de lípidos y/o de carotenoides y, más en concreto, de ácido eicosapentaenoico (EPA) y/o de ácido docosahexaenoico (DHA) y/o de ácido araquidónico (ARA) y/o de ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA) y/o de ácido linoleico y/o de ácido oleico.

## Preámbulo

20 La producción de las materias primas a partir de fuentes biológicas se ha vuelto cada vez más importante dado el contexto ecológico actual. Las células animales y vegetales, así como los microorganismos, se utilizan hoy día como productores de moléculas que son útiles para las industrias agroalimentaria (por ejemplo, alcoholes, ácidos orgánicos, ácidos grasos, polisacáridos, pigmentos, aminoácidos, enzimas o vitaminas), farmacéutica (antibióticos, compuestos con actividad farmacológica, proteínas exógenas o recombinantes), cosmética (pigmentos, compuestos orgánicos tales como ácidos, polisacáridos o ácidos grasos) y petroquímica (biocombustibles o productos intermedios que pueden convertirse en combustible, lubricantes o bioplásticos).

25 Por ejemplo, en la actualidad, los protistas son objeto de numerosos proyectos industriales ya que determinadas especies son capaces de acumular o de secretar cantidades importantes de compuestos valiosos, tales como lípidos, en particular ácidos grasos poliinsaturados.

30 La producción de moléculas de interés en las células se hace a escala industrial en general, mediante métodos de fermentación. Para llevar a cabo una fermentación a escala industrial, se deben tener en cuenta varios factores, por ejemplo, para los protistas, las condiciones de cultivo (autótrofo, mixótrofo o heterótrofo) según la cepa, la temperatura, las condiciones de luz y el tamaño de los fermentadores. Por ejemplo, los cultivos pueden igualmente realizarse en contenedores de un litro, en un laboratorio, en fotobiorreactores, en contenedores de 100 000 litros o bien dentro de estanques abiertos (varias hectáreas). Sin embargo, cuando se desarrollan las condiciones de cultivo ideales se deben tener en cuenta el consumo energético y de otros recursos, tales como la mano de obra y la facilidad de continuar el cultivo.

En cualquier caso, es deseable que las células se cultiven en las condiciones óptimas para aumentar el rendimiento de las moléculas a producir.

40 Existen tres tipos de procedimientos de fermentación que se utilizan corrientemente en el dominio de la producción de biomasa, a saber,

- El modo discontinuo (en inglés *batch*):

45 Se llena el tanque con el medio de cultivo esterilizado y luego se añade el inóculo. La fermentación se desarrolla a continuación sin añadir ningún suplemento importante de medio (principalmente los correctores de pH y antiespumante). El volumen permanece constante y la productividad de la biomasa es relativamente escasa. Al final de la fermentación, se vacía el fermentador y se reemplaza el contenido.

- El modo semicontinuo (en inglés *fed-batch*):

Este procedimiento de producción se basa en la alimentación progresiva del sustrato nutritivo durante el cultivo. Este modo se suele utilizar para alcanzar una densidad celular elevada en el fermentador.

- El modo continuo (en inglés *continuous*):

50 En este procedimiento se utiliza un fermentador que se suele denominar «quimiostato», en el cual se añade permanentemente un medio de cultivo nuevo, mientras que el líquido de cultivo se extrae permanentemente para mantener constante el volumen de cultivo.

La tasa de crecimiento de las células se puede controlar mediante la modificación del caudal de alimentación en materia nutritiva a la vez que se respetan los límites fisiológicos de cada tipo de célula o cepa (en función de su tasa de crecimiento específica máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ) en las condiciones específicas de un procedimiento).

5 El modo continuo permite que se cultiven los microorganismos en un estado de equilibrio fisiológico dado que corresponde a un equilibrio entre el crecimiento de la biomasa y la producción de uno o varios metabolitos de interés.

En el estado de equilibrio, las células crecen a una velocidad constante y todos los parámetros del cultivo permanecen constantes (pH, volumen, concentración de oxígeno disuelto, las concentraciones de los elementos nutritivos y de productos, densidad celular, etc.).

El modo continuo presenta, en particular, las ventajas siguientes:

- 10 - hace disminuir el coste de producción global de biomasa (menos operaciones de limpieza, esterilización, cultivo, inmovilización de equipos a nivel de fermentación);
- hace aumentar la productividad (cantidad de biomasa producida por hora);
- la recuperación de la biomasa de manera continua permite facilitar las operaciones posteriores al mismo tiempo que se optimiza el dimensionamiento de los equipos.

15 No obstante, los procedimientos continuos también presentan inconvenientes, sobre todo cuando la producción de la molécula de interés está disociada o parcialmente disociada de la fase de crecimiento celular. Así pues, cuando una sustancia de interés se produce fuera de esta fase de crecimiento óptimo (por ejemplo, al final del cultivo, durante la fase estacionaria del cultivo), es más difícil obtener rendimientos compatibles con los intereses económicos.

Otras desventajas relacionadas con el modo continuo son:

- 20 - la gestión de la mayor cantidad de vertidos (menor concentración de biomasa),
- la pérdida de la materia prima que no se consume (sustratos residuales) puede también tener un impacto sobre los procedimientos posteriores (extracción, secado, etc.).

25 En la patente de los EE. UU. n.º 6156570 se describe un procedimiento de cultivo celular en suspensión, en condiciones de heterotrofia, en el cual el cultivo se inicia en modo semicontinuo y se prosigue en modo continuo. Este procedimiento permite modificar el metabolismo energético de la célula, lo que da lugar a una producción escasa de lactato, lo que permite mantener una concentración celular elevada. Las células utilizadas son preferiblemente células de mamíferos, o de otra fuente animal (insectos, peces, etc.).

30 En la solicitud de patente internacional WO 2003/020919 se hace referencia a un sistema con numerosas unidades para el cultivo de células animales o vegetales con una densidad celular elevada, en suspensión, con el fin de obtener productos biológicos. Este procedimiento utiliza sobre todo un fermentador de precultivo en modo semicontinuo y un fermentador de cultivo en modo continuo. El procedimiento descrito se basa en la distribución espacial de las diferentes unidades, lo que permite ponerlas en funcionamiento de manera sinérgica.

35 En la solicitud de patente de los EE. UU. US 2009/0263889 se hace referencia a un procedimiento de cultivo de protistas en condiciones de heterotrofia, en particular del género *Schizochytrium* o *Thraustochytrium*, para producir lípidos celulares tales como el DHA. El cultivo se inicia en modo discontinuo y prosigue en modo continuo o comprende una etapa intermedia de cultivo en modo semicontinuo.

40 En la solicitud de patente internacional WO 2012/074502 se describen procedimientos y sistemas de cultivo de diferentes microorganismos fotoautótrofos, en concreto algas, diatomeas, cianobacterias, fotobacterias o plantas, en los que se utiliza un agente de estrés «biótico» (procedentes de otro organismo) o «abiótico» (inorgánico o producido por otros medios) para generar o acrecentar la producción de metabolitos. Este agente de estrés se puede utilizar en combinación con una iluminación. Este procedimiento combina las condiciones de cultivo fotoautótrofas y mixótrofas, o bien fotoautótrofas y heterótrofas.

45 En la solicitud de patente de los EE. UU. US 2009/209014 se describe un cultivo de *Schizochytrium* en modo heterótrofo que comprende numerosas etapas, entre las que hay una combinación continuo/discontinuo en modo heterótrofo, es decir, sin iluminación.

50 En la actualidad se ha hallado que un procedimiento de producción de biomasa que comprende el cultivo de células de modo continuo en las condiciones de mixotrofia o heterotrofia en un fermentador (etapa de «crecimiento»), a continuación la alimentación en continuo y como alternativa en los fermentadores que funcionan en modo semicontinuo por las células producidas y su cultivo en condiciones de mixotrofia o heterotrofia en dichos fermentadores (etapa de «maduración») permitía obtener a la vez un crecimiento de la productividad de la biomasa y de las moléculas de interés.

Ventajosamente, tal procedimiento de producción presenta en particular las ventajas siguientes:

- la biomasa producida en modo continuo tiene una tasa de crecimiento importante;

- la masa celular se ve aumentada significativamente por la acumulación de moléculas de interés durante el cultivo en modo semicontinuo;

5 - las fases de crecimiento y de producción de las moléculas de interés se mantienen con una separación física, lo que permite también que se optimicen los parámetros de cultivo para cada una de las etapas (luz, temperatura, pH, pO<sub>2</sub>, agitación, etc.);

- la fase de crecimiento en modo continuo alimenta a continuación los fermentadores de maduración y permite reducir considerablemente las fases de parada de producción relacionadas con la limpieza y la esterilización a las que se enfrentan durante los cultivos discontinuos (*Batch*) o semicontinuos (*Fed-Batch*);

10 - en comparación con un modo de producción continua, el procedimiento de la invención permite obtener una composición óptima de la biomasa producida. Es decir, que la utilización de los parámetros fisicoquímicos durante la fase de maduración que están orientados para que se acumule la molécula de interés permite mejorar considerablemente la productividad en comparación con una producción en modo continuo;

15 - según el procedimiento de la invención, hay menos vertidos en comparación con un modo continuo, porque la fase de maduración permite aumentar el rendimiento de la biomasa por litro y, por lo tanto, reducir la cantidad de vertidos a retirar por una cantidad de biomasa equivalente.

20 Las moléculas de interés cuya producción se investiga son, en concreto, pigmentos, tales como fucoxantina, astaxantina, zeaxantina, cantaxantina, equinenona, β-caroteno y fenicoxantina, (exo-) polisacáridos, aminoácidos, vitaminas, lípidos, sobre todo, ácidos grasos, y más en particular los ácidos grasos poliinsaturados. Entre ellos, algunos muy insaturados (AGMI) de la serie de los omega 3 (AGPI-ω3), en particular el ácido eicosapentaenoico (EPA o C20:5 ω3) así como su precursor, el ácido linoléico (ALA o C18:5 ω3) y el ácido docosahexaenoico (DHA o C22:6 ω3), y de la serie de los omega 6 (AGPI-ω6), en particular el ácido araquidónico (ARA o AA o incluso el ácido eicosatetraenoico C20:4 ω6), así como su precursor, el ácido linoleico (C18:2 ω6), tienen una importancia nutricional reconocida y presentan un gran potencial con respecto a las aplicaciones terapéuticas. Los ácidos grasos monoinsaturados, sobre todo el ácido oleico, también presentan un interés.

Los aceites de pescado, procedentes de la industria pesquera, son en la actualidad la principal fuente comercial de este tipo de ácidos grasos. Sin embargo, mientras que estos aceites encuentran nuevas aplicaciones (complemento alimentario en acuicultura, integración en las margarinas), los recursos pesqueros marinos se vuelven más escasos debido a la actividad de pesca intensiva.

30 Por lo tanto, las nuevas fuentes de estos ácidos grasos, tales como el ácido oleico, el EPA, el DHA, el ALA y el ARA, deben investigarse con el fin de dar respuesta, en el futuro, a la demanda creciente del mercado para este tipo de ácidos grasos poliinsaturados.

35 Los ácidos grasos de cadena corta (C1 a C7), por ejemplo, los ácidos acético, propanoico y butírico, o los ácidos grasos de cadena mediana (C8 a C12), por ejemplo, el ácido láurico, son también moléculas procedentes de microorganismos y, en particular, de los protistas.

Además, los carotenoides, como la astaxantina, la zeaxantina, la cantaxantina, la equinenona, el β-caroteno y la fenicoxantina, la luteína o la fucoxantina son también moléculas de interés producidas por microorganismos. En general se suelen utilizar como pigmentos, pero tienen también una función importante para la salud de los humanos como antioxidantes. Finalmente, presentan la capacidad de estimular el sistema inmunitario.

40 La luteína, así como la zeaxantina en cantidades mucho menos importantes, son los únicos carotenoides que se absorben en la sangre después de la ingestión y se acumulan en la retina humana. La luteína se relaciona con una posible reducción de los riesgos ligados a las lesiones oculares y cutáneas ocasionadas por la luz azul. Está sobre todo relacionada con la prevención de la degeneración macular senil (DMS).

45 Además de eso, las moléculas conocidas como «Mycosporine like amino acids» o «MAAs» en inglés, o aminoácidos de tipo micosporina en español, son moléculas de interés producidas por microorganismos tales como las bacterias marinas, las cianobacterias, los hongos y muchos otros organismos marinos.

Además de eso, los exopolisacáridos producidos por determinados microorganismos son moléculas de interés porque pueden entrar en la composición de determinadas preparaciones agroalimentarias como texturizante; o incluso como componente de determinadas formulaciones cosméticas, por ejemplo, como antibrillos o texturizante.

50 El procedimiento de la invención hace referencia al cultivo de toda clase de células, en particular, el cultivo de protistas para la producción de ácidos grasos y/o de pigmentos a escala industrial.

La mayoría de las especies de protistas encontradas en el agua dulce o en los océanos son por lo general autótrofas, es decir, solo pueden crecer por fotosíntesis. Para estas, la presencia en su medio de sustratos de carbono orgánico no les es favorable ni mejora su crecimiento. Sin embargo, un determinado número de especies de protistas, con

familias y orígenes muy diversos, se revelan como no estrictamente autótrofos. Es así como algunas de estas, denominadas heterótrofas, son capaces de desarrollarse en ausencia total de luz, a través de un metabolismo oxidativo (fermentación o respiración), es decir, explotando un sustrato de carbono orgánico, como los azúcares, como única fuente de carbono y de energía.

5 Otras especies de protistas, en las que la fotosíntesis permanece indispensable para su desarrollo, son capaces al mismo tiempo de sacar provecho de la fotosíntesis y de la materia orgánica presente en su medio. Estas especies intermedias, llamadas mixótrofas, pueden explotar la presencia de luz y de sustratos de carbono orgánico.

10 Esta peculiaridad de las algas denominadas «mixótrofas» parece estar relacionada con su metabolismo, que les permite hacer funcionar simultáneamente la fotosíntesis y el metabolismo oxidativo. Los dos tipos de metabolismo coexisten con un efecto global positivo sobre el crecimiento de las algas [Yang, C. et al. (2000); *Biochemical Engineering Journal*, 6: 87-102].

Existen otros organismos a los que se les considera mixótrofos. Por ejemplo, la bacteria *Paracoccus pantotrophus*, protistas tales como *Euglena*, y la planta *Dionaea muscipula*, son capaces de obtener energía de la luz. El método de cultivo según la invención es aplicable a las células de los organismos denominados «mixótrofos».

15 Entre las especies mixótrofas, podemos igualmente citar el caso de las especies «fotoheterótrofas» que se desarrollan únicamente a través de un metabolismo oxidativo (fermentación o respiración), pero en la cual la luz tiene un impacto sobre la célula por medio de los fotorreceptores, como por ejemplo el fototropismo (capacidad de orientarse con respecto a la luz), el desencadenamiento de los ciclos de reproducción sexual o más en general cuando la luz engendra una modificación del metabolismo. Estos mecanismos se conocen en numerosos organismos, como, por ejemplo, los hongos filamentosos de origen marino o incluso los protistas.

20 En la presente invención, por célula, organismo o microorganismo «mixótrofo» se entienden las células, organismos o microorganismos capaces de crecer con el uso de la luz y una fuente de carbono orgánico, e igualmente los microorganismos y las células igualmente denominados «fotoheterótrofos» que utilizan la luz para otra función además del crecimiento, como, por ejemplo, la producción de moléculas, tales como los carotenoides. Así pues, las células «mixótrofas» son capaces de inducir una actividad metabólica en respuesta a una iluminación natural o artificial, en las condiciones de mixotrofia.

En cualquier caso, es deseable que los microorganismos o las células se cultiven en las condiciones óptimas para aumentar el rendimiento de las moléculas de interés, en particular de uno o varios ácidos grasos y/o de los pigmentos a producir.

30 En concreto, sería deseable que se puedan obtener rendimientos de biomasa, de lípidos y de carotenoides más importantes de lo que se describe en la técnica anterior para una explotación industrial más eficaz y más rentable. Así pues, es preferible tener un rendimiento lo más elevado posible (por ejemplo, más allá de 80 g/l de materia seca, más del 30% de ácidos grasos en peso con respecto al peso total de la materia seca, y más del 0,1% en peso de carotenoides con respecto al peso total de materia seca).

### 35 Descripción detallada

Así pues, la invención hace referencia, según un primer aspecto, a un procedimiento de producción de biomasa de células de organismos unicelulares eucariotas capaces de crecer utilizando la luz y una fuente de carbono orgánico, caracterizada por que consiste en:

40 a) el cultivo de células en modo continuo en las condiciones de mixotrofia o heterotrofia en un fermentador, denominado «fermentador de cabeza», luego

b) la alimentación en continuo de  $n$  fermentadores, denominados «fermentadores de maduración», que funcionan en modo semicontinuo, en donde  $n$  es un número entero superior a 2, preferiblemente de 2 a 10, por las células producidas en la etapa a) y su cultivo en las condiciones de mixotrofia

45 y en donde el cultivo de las células en las condiciones de mixotrofia se realiza en las condiciones de iluminación discontinua y/o variable en el transcurso del tiempo.

Según un modo de realización, la invención hace referencia a un procedimiento de cultivo que comprende una etapa de crecimiento en mixotrofia o heterotrofia y una etapa de acumulación de moléculas de interés en las condiciones de mixotrofia.

50 Por «condiciones de mixotrofia» se entiende un cultivo con un aporte de luz y un aporte de sustrato de carbono orgánico.

Por «condiciones de heterotrofia» se entiende un aporte de sustrato de carbono orgánico y en la oscuridad.

Por «protistas» se entienden todos los microorganismos unicelulares eucariotas. Las microalgas (*Chlorella*, *Tetraselmis*, *Nitzschia*, etc.), los hongos unicelulares (*Schizochytrium*, *Aurantiochytrium*, etc.) o los flagelados

heterótrofos (*Cryptocodinium*, etc.) forman parte del grupo de los protistas.

Por «cepa» se entiende no sólo las cepas naturales, sino también los mutantes de dichas cepas naturales.

5 Por «mutantes» se entiende un organismo procedente de la cepa original cuyo patrimonio genético se ha modificado mediante un procedimiento natural, o bien mediante métodos fisicoquímicos conocidos por el experto en la técnica que pueden generar mutaciones aleatorias (UV, etc.), o bien mediante métodos de ingeniería genética.

10 La etapa a) es la fase de crecimiento de las células que permite alcanzar una población importante. En general, se elige un medio de cultivo (solución de alimentación de las células) específico para alcanzar este objetivo, en función del tipo de células cultivadas y la una o varias moléculas de interés a producir. Por ejemplo, en el caso de los protistas, el medio de cultivo se enriquece con una solución de alimentación que contiene macroelementos, oligoelementos y vitaminas. El medio contiene un sustrato de carbono orgánico que permite el cultivo en modo heterótrofo o mixótrofo.

15 La etapa b) es una fase de acumulación de las moléculas de interés. Preferiblemente, esta fase utiliza una segunda solución de alimentación que permite orientar preferiblemente el metabolismo hacia la acumulación de esta molécula de interés. Por ejemplo, en el caso de la producción de lípidos por los protistas, esta orientación se puede realizar mediante el aumento de la razón de la concentración del carbono por la de nitrógeno asimilable (razón C/N).

20 En la práctica, un primer fermentador que funciona de modo continuo permite el crecimiento (la etapa a)) de las células y el flujo saliente (o trasvase) de este fermentador de crecimiento alimenta los tanques de maduración donde la biomasa se enriquece en las moléculas de interés (la etapa b)).

El procedimiento se puede describir como un procedimiento denominado «desacoplado», ya que las fases de crecimiento según la etapa a) y de maduración según la etapa b) están separadas tanto desde el punto de vista físico como temporal.

La etapa a) de cultivo de las células en modo continuo del procedimiento de producción de biomasa según la invención, o «etapa de crecimiento», se puede llevar a cabo en un fermentador conocido por el experto en la técnica, como por ejemplo, el «quimiostato».

25 El arranque del cultivo de la etapa a) se puede realizar de manera clásica (véase la figura 1). Se pueden realizar previamente unas etapas de precultivo con el objeto de obtener la concentración celular deseada para empezar la producción de biomasa en continuo, a saber, entre 2 y 50 g/l, preferiblemente 5 y 40 g/l.

30 En general, el incremento a escala a partir del criotubo se hace en varias etapas de cultivos previos. Por ejemplo, se puede hacer en tres etapas, dos etapas en matraces Erlenmeyer (precultivo 1 y precultivo 2) y una etapa en fermentador (prefermentador). El crecimiento en el matraz se desarrolla en modo discontinuo (*batch*). En general, el crecimiento en el prefermentador se hace de igual manera en modo discontinuo.

Por ejemplo, el cultivo puede pasar progresivamente de un cultivo en el matraz Erlenmeyer de 20 ml a un cultivo en el matraz Erlenmeyer de 2 l, luego a un cultivo en fermentador (prefermentador) en modo discontinuo (*batch*), y luego a un cultivo en un fermentador en modo continuo («fermentador de cabeza»). Por ejemplo, el fermentador en modo discontinuo tiene un volumen de 40 l y el fermentador de cabeza tiene un volumen de 4 000 l.

35 El arranque del cultivo en el fermentador de cabeza tiene una fase de puesta en marcha en la cual no se alcanza el régimen continuo, es decir, que el crecimiento de las células no está estabilizado o no está en fase con el caudal de alimentación del medio nuevo. Se trata de una fase «para alcanzar el equilibrio» que también se podría llamar «fase de puesta en régimen permanente». Esta «fase de puesta en régimen permanente» tiene una duración que depende de la tasa de crecimiento de los microorganismos cultivados o, más en concreto, de la tasa de crecimiento específica o  $\mu_{\text{máx}}$ . A modo de ejemplo, esta duración puede estar comprendida entre 5 y 200 horas, preferiblemente entre 10 y 100 horas.

40 De manera general, una vez que se alcanza el régimen permanente, se pone en marcha un caudal de trasvase del fermentador de cabeza hacia uno o varios fermentadores de maduración con un caudal equivalente al caudal de alimentación del medio de cultivo nuevo. Este trasvase alimenta un primer fermentador de maduración hasta que se transfiere el volumen deseado, luego se reorienta el trasvase hacia otro tanque de maduración. El experto en la técnica sabrá determinar el volumen de inóculo necesario en función del tipo de células a cultivar, de la molécula de interés a producir y de la capacidad de los tanques de maduración según un modo de realización. Este volumen de inóculo puede estar comprendido entre el 10 y el 90 % de la capacidad del fermentador de maduración, en función de las células cultivadas; por ejemplo, aproximadamente el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 % u 80 % de la capacidad del fermentador de maduración.

50 El trasvase hacia los fermentadores de maduración se realiza de manera convencional mediante el uso de los equipos conocidos.

De manera general, durante la fase de maduración se emplea un medio de cultivo diferente del utilizado durante la etapa a). Según los modos de realización diferentes, este medio de cultivo se aporta al fermentador de maduración

de manera simultánea, o anterior, o posterior, al inóculo que procede del trasvase desde el fermentador de cabeza.

El volumen del cultivo en el fermentador de la etapa a) se determina en función del volumen final del cultivo deseado para los cultivos en los fermentadores de maduración. En general, el fermentador de cabeza tiene un volumen del 5 al 100 %, preferiblemente del 10 % al 50 %, y más preferiblemente aproximadamente del 20 % del volumen del fermentador de maduración al cual alimenta. Por ejemplo, un fermentador de cabeza que tiene un volumen de 4 000 l puede alimentar a un fermentador de maduración de 20 000 l. Si los  $n$  fermentadores de maduración tienen volúmenes diferentes, el volumen del fermentador más importante es el que determinará el volumen del fermentador de cabeza.

El medio de cultivo utilizado en la etapa a) se elige según las características de las células cultivadas.

Se puede utilizar un medio mínimo o un medio nutritivo enriquecido y se puede citar a modo de ejemplo el medio de cultivo de Verduyn para el crecimiento de protistas.

Para el cultivo de microorganismos en general o de protistas, el medio de cultivo para la etapa a) contiene en general una fuente de nitrógeno y de fosfato, así como un sustrato de carbono orgánico. Este último permite un cultivo en modo mixótrofo.

Un ejemplo de este tipo de medio es el medio de Verduyn modificado (sales marinas a 15 g/l,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 3 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 1 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 0,5 g/l,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  a 24 mg/l,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 3 mg/l,  $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 3 mg/l,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 0,04 mg/l,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 10 mg/l, pantotenato a 3,2 mg/l, hidrocloreto de tiamina a 9,5 mg/l, vitamina B12 a 0,15 mg/l, antiespumante a 0,1 ml/l) al cual se le añade un sustrato de carbono orgánico.

Otro ejemplo de un medio de cultivo es: sales marinas a 25 g/l,  $\text{KNO}_3$  a 3 g/l,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a 1 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 2,5 g/l,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  a 24 mg/l,  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  a 0,3 g/l,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 1 mg/l,  $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 1 mg/l,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 0,04 mg/l,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 10 mg/l, extracto de levadura a 2 g/l, biotina a 0,15 mg/l, hidrocloreto de tiamina a 9,5 mg/l, vitamina B12 a 0,15 mg/l, antiespumante a 0,1 ml/l, al cual se le añade un sustrato de carbono orgánico.

Según un modo de realización de la invención, el sustrato de carbono orgánico tiene una concentración de 5 mM a 1,1 M (de 0,9 a 200 g/l), preferiblemente de 50 mM a 800 mM (de 9 a 144 g/l).

Este sustrato de carbono orgánico comprende preferiblemente, bajo forma pura o de mezcla: glucosa, derivados de celulosa, lactato, almidón, lactosa, sacarosa, acetato y/o glicerol.

El sustrato de carbono orgánico contenido en el medio de cultivo puede consistir en moléculas complejas o en una mezcla de sustratos. Los productos procedentes de la biotransformación del almidón, por ejemplo a partir del maíz, del trigo o de patata, en particular los hidrolizados de almidón, que están formados por moléculas de pequeño tamaño, constituyen, por ejemplo, sustratos de carbono orgánico adaptados al cultivo en mixotrofia de las células según la invención.

Se le añade más sustrato al medio de cultivo durante el procedimiento de cultivo para mantener una concentración suficiente para el cultivo. El experto en la técnica sabe cómo asegurarse de que se mantiene el nivel del sustrato de carbono orgánico.

Preferiblemente, el sustrato de carbono orgánico comprende glucosa, glicerol, a una concentración equivalente o superior a 300 mM.

A modo de ejemplo, el cultivo según la etapa a) de las cepas de protistas del género *Schizochytrium* o *Aurantiochytrium* para la producción de DHA se puede realizar en un medio de cultivo salino (sal marina a 10-20 g/l, preferiblemente 15 g/l) con una concentración de glucosa de 5 a 200 g/l, preferiblemente de 30 a 100 g/l, y más preferiblemente de 30 a 60 g/l. Según un modo de realización, el medio de cultivo contiene también macroelementos, tal como las sales de magnesio o las sales de potasio, a una concentración de 1 a 50 g/l, preferiblemente de 2 a 25 g/l. Según un modo de realización, el medio contiene sales de amonio, preferiblemente a una concentración de 1,5 a 7,5 g/l. Contiene también los oligoelementos utilizados de manera convencional para el cultivo de protistas, tales como las sales de manganeso, de zinc, de cobalto, de molibdeno y de cobre, de níquel y de hierro. Los valores típicos para la concentración de estos oligoelementos son de 0,02 a 15 mg/l para cada oligoelemento. Por ejemplo, las sales de magnesio y de zinc pueden estar presentes a 2-4 mg/l, las sales de cobalto y de molibdeno pueden estar presentes en poca cantidad, tal como 0,01 a 0,04 mg/l, preferiblemente entre 0,02 a 0,03 mg/l. Las sales de cobre y de níquel pueden estar presentes a 1-4 mg/l, preferiblemente a 1-2 mg/l. En general, las sales de hierro están presentes en una cantidad más importante con respecto a otras sales, por ejemplo, a una concentración de 8 a 15 mg/l.

Según otro modo de realización, las sales de magnesio están presentes a 70-300 mg/l. Según un modo de realización, el medio comprende de igual modo vitaminas, tal como tiamina, vitamina B12, pantotenato y, posiblemente, un estabilizante.

Según un modo de realización de la invención adaptado para alcanzar elevadas densidades celulares de *Aurantiochytrium* ( $1$  a  $3 \times 10^9$  células/ml), se puede utilizar el medio de cultivo denominado «Medio pie» de la tabla 1 que viene a continuación.

	<b>Medio pie</b>	<b>Solución de alimentación</b>
Fuente carbono	1 a 1,6 CMol	3,7 CMol
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1,5 a 7,5 g/l	5 a 10 g/l
Sal marina	5 a 30 g/l	10 a 30 g/l
Ca	25 a 70 mg/l	100 a 200 mg/l
Mn	1 a 10 mg/l	4 a 20 mg/l
Zn	0,1 a 1 mg/l	0,5 a 2 mg/l
S	0,5 a 1,5 g/l	2 a 4 g/l
Co	0,1 a 1 mg/l	0,5 a 2 mg/l
Mo	0,01 a 0,5 mg/l	0,05 a 1,5 mg/l
Cu	0,05 a 0,3 mg/l	0,25 a 0,8 mg/l
Ni	0,02 a 0,2 mg/l	0,1 a 0,5 mg/l
K	0,5 a 2 g/l	3 a 5 g/l
Mg	70 a 300 mg/l	250 a 750 mg/l
P	0,3 a 1 g/l	1,3 a 2,5 g/l
Fe	5 a 10 mg/l	15 a 25 mg/l
Tiamina	15 a 50 mg/l	50 a 150 mg/l
Vitamina B12	0,2 a 0,7 mg/l	0,7 a 2 mg/l
Pantotenato	0,05 a 0,15 mg/l	15 a 45 mg/l
Estabilizante (tipo EDTA)	A fijar por el preparador	A fijar por el preparador

Tabla 1: Ejemplo de medios de cultivo útiles para el cultivo de cepas de *Aurantiocytrium*, según la etapa a) del procedimiento de cultivo.

5 El «medio pie» corresponde al medio que se puede utilizar para el arranque del cultivo en continuo. A continuación, «la solución de alimentación» se puede utilizar para alimentar el fermentador en continuo.

10 De manera general, cuando la concentración de biomasa en el fermentador de cabeza ha alcanzado un equilibrio, por ejemplo, para protistas, bacterias y levaduras entre aproximadamente 5 y 100 g/l, preferiblemente entre aproximadamente 10 y 70 g/l de concentración de biomasa, el trasvase desde el fermentador de cabeza sirve para alimentar de manera continua y sucesiva los diferentes fermentadores de maduración que funcionan en modo semicontinuo. El cultivo de las células se mantiene así pues en condiciones de mixotrofia o heterotrofia en dichos fermentadores (etapa de «maduración») con el objetivo de producir las moléculas de interés. Así pues, de manera

15 general, la alimentación de los fermentadores de maduración según la etapa b) arranca cuando el fermentador de cabeza está en régimen permanente a una densidad celular estable. Por ejemplo, para el cultivo de los protistas, esta densidad celular podría estar entre  $10^7$  y  $10^9$  células por ml. Para las levaduras, esta densidad celular podría estar entre  $10^8$  y  $10^9$  células por ml. Para las bacterias, esta densidad celular podría estar entre  $10^9$  y  $10^{10}$  células por ml.

La alimentación de los fermentadores de maduración según la etapa b) se hace (en general) de manera sucesiva, es decir, que se alimenta un fermentador  $n$  de maduración con el trasvase desde el fermentador de cabeza antes de pasar al fermentador de maduración siguiente,  $n + 1$ .

El volumen de inóculo utilizado para inocular el fermentador de maduración es en general dependiente de la célula

cultivada y de la molécula o moléculas de interés a producir, y del volumen necesario en el fermentador de maduración antes de pasar a la etapa de producción de la molécula de interés. Por ejemplo, en el caso de protistas, levaduras y bacterias, el volumen puede representar entre el 10 y el 70 % del volumen final de la suspensión celular en el fermentador de maduración, preferiblemente entre el 20 y el 60 %, más preferiblemente entre el 30 y el 50 %.

5 De manera general, una vez que se ha alcanzado el volumen de inóculo deseado en el fermentador de maduración  $n$ , se alimenta el segundo ( $n + 1$ ) fermentador de maduración (o «madurador»), después se alimenta el tercer ( $n + 2$ ) fermentador de maduración, etc.

10 Según un modo de realización, se para el cultivo en el fermentador de maduración, a continuación se vacía el fermentador cuando la producción de la molécula o moléculas de interés ha alcanzado el nivel deseado, por ejemplo, en el caso de los protistas del género *Aurantiochytrium*, cuando el título del DHA está entre 5 y 30 g/l, y el título del pigmento carotenóide está entre 0,1 y 10 mg/g de biomasa seca.

15 El vaciado se realiza de manera convencional con herramientas que permiten el tratamiento de la biomasa con el objeto de extraer la molécula o moléculas de interés. Después de haberlo vaciado, el fermentador de maduración se limpia, por lo general con un equipo específico que está integrado en los tanques de los fermentadores, y luego se esteriliza.

20 Por ejemplo (véase la tabla 2 y el esquema según la figura 1), con un tiempo de cultivo en los fermentadores de maduración de 72 horas, el primer día, día D, se llena el fermentador de maduración 1 y los otros fermentadores de maduración permanecen en espera; a D + 1, se llena el fermentador de maduración 2 (cultivo N + 2) y en el fermentador de maduración 1 prosigue el cultivo; a D + 2, se llena el fermentador de maduración 3 y en los fermentadores de maduración 1 y 2 prosiguen los cultivos; a D + 3, se limpia el fermentador de maduración 1, se llena el fermentador de maduración 4 y en los fermentadores de maduración 2 y 3 prosiguen los cultivos.

	Fermentador de maduración 1	de	Fermentador de maduración 2	de	Fermentador de maduración 3	de	Fermentador de maduración 4
Día D	Cultivo N		Espera		Espera		Espera
Día D + 1	Cultivo N		Cultivo N + 1		Espera		Espera
Día D + 2	Cultivo N		Cultivo N + 1		Cultivo N + 2		Espera
Día D + 3	Limpieza esterilización	y	Cultivo N + 1		Cultivo N + 2		Cultivo N + 3
Día D + 4	Cultivo N + 4		Limpieza esterilización	y	Cultivo N + 2		Cultivo N + 3
Día D + 5	Cultivo N + 4		Cultivo N + 5		Limpieza y esterilización		Cultivo N + 3

Tabla 2

25 El número de fermentadores de maduración alimentados por el fermentador de cabeza es superior a 2 y, de manera general, este número está limitado solo por el espacio disponible en el que almacenar dichos fermentadores y sus equipos anexos. En general, el número de fermentadores de maduración es de 2 a 10, preferiblemente de 2 a 6.

Según un modo de realización de la invención, la duración del cultivo de maduración varía entre 10 y 200 horas, preferiblemente entre 20 y 100 horas. El ciclo ilustrado en la tabla varía en función de este tiempo. Por ejemplo, para las células vegetales, la duración del cultivo de maduración puede variar entre 48 y 200 horas.

30 Para el cultivo de protistas y levaduras, esta etapa de cultivo en modo semicontinuo se realiza por lo general durante 24 a 200 h en cada fermentador, preferiblemente durante 48 h a 96 h, más preferiblemente de 72 h a 96 h.

35 La composición del medio de cultivo para la etapa b) permite mantener un crecimiento residual, que favorece la acumulación de las moléculas de interés. Por «crecimiento residual» se entiende una multiplicación de las células con una tasa de crecimiento comprendida entre el 1 y el 90 % de la tasa de crecimiento de la etapa a), pero que permite mejorar la productividad de la biomasa y de la molécula o moléculas de interés.

Por ejemplo, para la producción de los lípidos por los protistas, la tasa de crecimiento de cultivo continuo es de 0,05 a 0,20 h<sup>-1</sup>, preferiblemente de 0,10 h<sup>-1</sup>.

La tasa de crecimiento caracteriza el crecimiento de la población a lo largo del tiempo. La tasa de crecimiento ( $\mu$ ) se

calcula según la fórmula:

$$\mu = (\ln N2 - \ln N1)/(t2 - t1)$$

donde N1 es la cantidad de biomasa a tiempo t1 y N2 es la cantidad de biomasa a tiempo t2. La cantidad de biomasa se puede expresar en densidad óptica, densidad celular o masa seca. Los tiempos t1 y t2 se expresan en horas. El valor de  $\mu$  se expresa en  $h^{-1}$  (1/hora).

El medio de cultivo utilizado para la fermentación según la etapa b) del cultivo en semicontinuo se elige según la naturaleza de las células cultivadas. Preferiblemente, este medio de cultivo permite orientar preferiblemente el metabolismo de las células cultivadas hacia la acumulación de una o varias moléculas de interés. Para determinadas células, la limitación de un elemento en el medio de cultivo es un método que permite favorecer la acumulación de una molécula. A modo de ejemplo, podemos citar los protistas que pueden aumentar la acumulación de lípidos durante una limitación de nitrógeno. Por limitación de nitrógeno se entiende una concentración de nitrógeno insuficiente en el medio de cultivo para garantizar un crecimiento normal de las células, y que se traduce en una modificación del metabolismo que favorece la acumulación del carbono en forma de lípidos. Esta modificación del metabolismo puede también obtenerse con un aumento de la razón C/N (razón de la concentración de carbono por la de nitrógeno asimilable).

Sin embargo, el medio de cultivo contiene una fuente de carbono orgánico que permite un crecimiento mixótrofo o heterótrofo. Típicamente, para un cultivo de protista, el carbono orgánico está presente a una concentración de 10 a 90 g/l (de 55 mM a 500 mM).

En general, el cultivo según la etapa b) de maduración de los protistas para la producción de lípidos o de pigmentos se puede realizar en el medio de cultivo salino (sal marina a 10-30 g/l) que comprende aproximadamente de 20 a 200 g/l (0,1 a 1,1 M) de sustrato de carbono orgánico, aproximadamente de 1 a 15 g/l de amonio y aproximadamente de 0,9 a 3,5 g/l de fosfato. A modo de ejemplo para la producción de DHA con la cepa de *Aurantiochytrium*, el medio de cultivo (reconstituido a partir del volumen de la suspensión celular procedente del fermentador de cabeza y del volumen de la solución de alimentación concentrada) comprende de 100 a 200 g/l de glucosa, aproximadamente de 5 a 10 g/l de amonio y de 1 a 2 g/l de fosfato. Según un modo de realización de la invención, el medio de cultivo contiene igualmente macroelementos, oligoelementos y vitaminas.

Según un modo de realización, la solución nutritiva utilizada en la etapa de maduración contiene una fuente de carbono (por ejemplo, glucosa o glicerol), una fuente de nitrógeno (por ejemplo,  $(NH_4)_2SO_4$ ), una fuente de fosfato (por ejemplo,  $KH_2PO_4$ ). Preferiblemente, la razón entre el C (carbono), el N (nitrógeno) y el P (fosfato) (C/N/P) es 530:11:1 siempre con la posibilidad de tener hasta varias veces más o menos de nitrógeno (N), y/o hasta dos veces más o menos de fosfato (P), por ejemplo, se pueden utilizar las siguientes relaciones 530:22:1; 530:5,5:1; 530:22:0,5; 530:11:2; 530:22:2; 530:5,5:0,5; 530:11:0,5; 530:5,5:2.

En general, el cultivo según la etapa b) de maduración de las cepas de las levaduras para la producción de los pigmentos carotenoides se puede hacer en el medio de cultivo que comprende aproximadamente de 10 a 100 g/l de sustrato de carbono orgánico, aproximadamente de 0,15 a 15 g/l de amonio y aproximadamente de 0,9 a 9 g/l de fosfato. A modo de ejemplo para la producción de astaxantina en *Rhodotorula glutinis*, el medio de cultivo comprende 20 g/l de glucosa, aproximadamente 3 g/l de amonio y 1 g/l de fosfato.

Según un modo de realización, la etapa b) se realiza a una temperatura más baja que la etapa a). Los inventores han constatado que, según este modo de realización, la cantidad de lípidos, en particular el DHA, producidos aumenta con respecto a un cultivo donde la etapa b) se hace a la misma temperatura que la etapa i). En efecto, según el procedimiento de la invención, la temperatura óptima de crecimiento es superior a la temperatura óptima de producción del DHA. Por lo general, se puede realizar una etapa b) a 1-8 °C menos que la temperatura a la cual se realiza la etapa i). Por ejemplo, la etapa a) del cultivo se puede llevar a 25 °C mientras que la etapa b) se puede llevar a 18 °C, 19 °C, 20 °C, 21 °C, 22 °C o 23 °C. Por ejemplo, la etapa a) del cultivo se puede llevar a 22 °C mientras que la etapa b) se puede llevar a 18 °C, 19 °C, 20 °C o 21 °C. Por ejemplo, la etapa a) del cultivo se puede llevar a 27 °C mientras que la etapa b) se puede llevar a 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C o 26 °C.

Una temperatura baja favorece también la acumulación de pigmentos.

Más en concreto, las condiciones de mixotrofia se pueden llevar a cabo en las condiciones de iluminación discontinua y/o variable a lo largo del tiempo. Por iluminación discontinua debe entenderse una iluminación interrumpida por periodos de oscuridad. En particular, la iluminación puede ser en forma de destellos. Un destello, en el sentido de la invención, es una emisión luminosa de corta duración, es decir, de menos de 30 minutos. La duración puede ser de menos de 15 minutos, preferiblemente de menos de 5 minutos o, más preferiblemente aún, de menos de 1 minuto. Según determinados modos de realización de la invención, la duración del destello puede ser de menos de un segundo. Por ejemplo, la duración del destello puede ser de 1/10 de segundo, o de 2/10 de segundo, o 3/10 de segundo, o 4/10 de segundo, o 5/10 de segundo, o 6/10 de segundo, o 7/10 de segundo, u 8/10 de segundo, o 9/10 de segundo. La emisión luminosa, o el destello, es por lo general de una duración superior a 15 segundos. La duración del destello está comprendida por lo general entre 5 segundos y 10 minutos, preferiblemente entre 10 segundos y 2 minutos, más preferiblemente entre 20 segundos y 1 minuto. Estas duraciones de destello son idóneas para los aportes de luz de

«baja frecuencia».

5 Según este último modo de realización, donde el régimen de iluminación (el aporte de luz) es de «baja frecuencia», el número de destellos está comprendido entre aproximadamente 2 y 3600 por hora. Puede estar comprendido, por ejemplo, entre 100 y 3600 destellos por hora. Puede también estar comprendido entre 120 y 3000, o entre 400 y 2500, o entre 600 y 2000, o entre 800 y 1500 destellos por hora. Puede también estar comprendido entre 2 y 200, preferiblemente entre 10 y 150, más preferiblemente entre 15 y 100, y más preferiblemente aún entre 20 y 50 por hora.

Según un modo de realización, un destello tiene una duración entre 1/150 000 segundos y 1/1000 segundos. Estas duraciones de destello son adecuadas para los regímenes de iluminación de «elevada frecuencia», es decir, con frecuencias de destello de 150 kHz a 1 kHz, respectivamente.

10 Según este modo de realización donde el régimen de iluminación (el aporte de la luz) es de «elevada frecuencia», los destellos pueden tener lugar entre  $3,6 \times 10^5$  y  $5,4 \times 10^9$  veces por hora. En este caso, la variación de la luz tiene una frecuencia entre 1 kHz y 150 kHz, es decir, entre 1000 y 150 000 destellos por segundo. El aporte de luz según este último modo de realización de la invención se denomina de «elevada frecuencia».

15 El número de destellos por hora se elige en función de la intensidad y de la duración de los destellos (véase más adelante). En general, la intensidad de la luz aportada en forma de destellos está entre 50 y 1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , preferiblemente entre 50 y 500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , o 50 y 400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , y más preferiblemente entre 150 y 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (1  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  corresponde a  $1\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Einstein), unidad utilizada a menudo en la bibliografía).

20 Según otro modo de la invención, la iluminación puede ser variable, lo que significa que la iluminación no está interrumpida por las fases de oscuridad, sino que la intensidad luminosa varía a lo largo del tiempo. Esta variación de la intensidad de la luz es regular y puede ser periódica o cíclica. Según la invención, también se puede proceder a un aporte luminoso que tenga fases de iluminación continuas y discontinuas.

Por iluminación variable se entiende que la intensidad de la luz varía de manera regular al menos dos veces por hora. Un ejemplo de condiciones de iluminación adaptadas al método de la invención se describe en la solicitud de patente francesa n.º 1057380.

25 La iluminación presenta, preferiblemente, variaciones de intensidad cuya amplitud está por lo general comprendida entre 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y 2000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , preferiblemente entre 50 y 1500, más preferiblemente entre 50 y 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Según un modo de realización preferido, la iluminación presenta variaciones de intensidad cuya amplitud está comprendida entre 50 y 1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , preferiblemente entre 50 y 400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , en donde estas variaciones tienen lugar entre 2 y 3600, preferiblemente entre 2 y 200 veces por hora.

30 Estas variaciones pueden tener lugar, por lo general, entre 2 y 3600 veces por hora, preferiblemente entre 50 y 500 veces, más preferiblemente entre 100 y 200 veces por hora. Estas condiciones de cultivo permiten aportar una cantidad definida de luz. Este aporte luminoso puede comprender fases de iluminación discontinua y/o variable, con variaciones de intensidad que pueden tener amplitudes idénticas o diferentes.

35 Se ha descubierto que una iluminación variable y/o discontinua de los cultivos, en particular en la puesta en práctica de un cultivo en modo mixótrofo, tenía un impacto favorable sobre el desarrollo de las células, o la producción de las moléculas de interés, en particular de protistas y células vegetales, y hacía que se incrementara la productividad de estas, sobre todo en lo que se refiere a su producción de moléculas de interés, tales como lípidos o pigmentos. Sin comprometerse con la teoría, el inventor considera que un aporte discontinuo y/o variable de luz a las células tiene por efecto el de provocar un «estrés» favorable al crecimiento y a la síntesis de los lípidos. Este fenómeno se podría explicar, en parte, por el hecho de que, en la naturaleza, las células tienen tendencia a acumular reservas lipídicas para resistir a las inclemencias de su entorno.

40 Según un modo de realización de la invención, en el caso de la mixotrofia, el cultivo según la etapa a) se hace en presencia de destellos. La intensidad de los destellos está comprendida entre 50 y 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , la duración de los destellos está comprendida entre aproximadamente 1/10 de segundo y 5 minutos, preferiblemente entre aproximadamente un segundo y un minuto, y el número de destellos por hora puede variar entre 2 y 3600, preferiblemente entre 2 y 360 por hora.

45 Según un modo de realización de la invención, el cultivo según la etapa b) se realiza en presencia de destellos. La intensidad de los destellos está comprendida entre 200 y 2000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , la duración de los destellos está comprendida entre aproximadamente 1/10 de segundo y 10 minutos, preferiblemente entre aproximadamente 1/10 de segundo y 5 minutos, y el número de destellos por hora puede variar entre 2 y 3600, preferiblemente entre 20 y 1000 por hora.

50 Según un modo de la invención y cualquiera que sean las condiciones de iluminación, la intensidad de la luz aportada al cultivo en la etapa a) y en la etapa b) varía en función de la densidad celular. Cuanto más denso es el cultivo, más intensa puede ser la luz. La densidad celular es el número de células por mililitro y se mide según las técnicas conocidas por el experto en la técnica.

55

- 5 Por ejemplo, para los protistas, las bacterias y las levaduras, en el estadio inicial del cultivo según la etapa a), cuando la densidad celular está entre aproximadamente  $10^7$  y  $5 \times 10^7$  células por mililitro y para una duración de destellos que varía entre 1 segundo y 60 minutos con 2 y 360 destellos por hora, la intensidad luminosa puede estar entre 50 y  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , preferiblemente entre 50 y  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Cuando el cultivo alcanza una densidad entre  $10^8$  y  $10^9$  células por mililitro, la intensidad luminosa puede aumentarse hasta entre 100 y  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , por ejemplo, preferiblemente, entre 200 y  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Cuando el cultivo, en el estado final, alcanza una densidad entre  $10^9$  y  $10^{10}$  células por mililitro, la intensidad luminosa puede aumentarse hasta entre 200 y  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , por ejemplo, preferiblemente, entre 200 y  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .
- 10 Para el cultivo de los protistas, de las bacterias y de las levaduras según la etapa b), para una duración de destellos que varía entre 1/10 de segundo y 30 minutos con 2 y 3600 destellos por hora, la intensidad luminosa puede aumentarse hasta entre 200 y  $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , por ejemplo, preferiblemente, entre 300 y  $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .
- Según determinados modos de realización, por ejemplo, cuando la duración de los destellos es, por ejemplo, de menos de un minuto o de menos de un segundo, la intensidad de la luz puede ser más importante con respecto a los valores citados más arriba.
- 15 Tal y como se detalla más adelante (véanse las tablas 3A y 3B), los géneros de protistas contemplados por el procedimiento de la invención caen en dos categorías: el grupo 1 («no fotosintético») y el grupo 2 («fotosintético»). De manera general, en teoría, las cepas del grupo 1 necesitarán menos luz, o podrán explotar de manera diferente la luz, para crecer y para producir las moléculas de interés con respecto al grupo 2. En cambio, cada una de las cepas por separado podrá tener necesidades de iluminación diferentes. El experto en la técnica sabe ajustar los parámetros exactos de luz según la cepa en cultivo en función de sus necesidades.
- 20 Según un modo de realización de la invención, el cultivo de las cepas que pertenecen a los géneros *Schizochytrium*, *Aurantiochytrium* y *Cryptocodinium* (grupo 1) se realiza con una intensidad de luz entre 75 y  $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , preferiblemente entre 75 y  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , más preferiblemente entre 150 y  $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Según este modo de realización, la intensidad de la luz varía entre 2 y 200 veces por hora. La amplitud de las variaciones de intensidad está comprendida entre 70 y  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 70 y  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y preferiblemente entre 100 y  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .
- 25 Según un modo de realización de la invención, el cultivo de las cepas que pertenecen a los géneros *Schizochytrium*, *Aurantiochytrium* y *Cryptocodinium* (grupo 1) se realiza con destellos.
- Por ejemplo, según un modo de realización, el cultivo de los géneros del grupo 1 está iluminado con destellos de una intensidad de  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , con 30 destellos por hora.
- 30 Según otro modo de realización de la invención, el cultivo de las cepas que pertenecen a los géneros *Tetraselmis*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Nitzschia* y *Haematococcus* (grupo 2) se realiza con una intensidad de luz entre 75 y  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , más preferiblemente de 75 a  $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , más preferiblemente de 75 a  $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Según este modo de realización, la intensidad de la luz varía entre 2 y 3600 veces por hora. La amplitud de las variaciones de intensidad está comprendida entre 70 y  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 70 y  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y, preferiblemente, entre 100 y  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Según un modo de realización de la invención, el cultivo de las cepas que pertenecen a los géneros *Tetraselmis*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Nitzschia* y *Haematococcus* (grupo 2) se realiza con destellos.
- 35 Por ejemplo, según un modo de realización, el cultivo de los géneros de *Tetraselmis* y *Scenedesmus* se ilumina con destellos de una intensidad de  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , con 120 destellos por hora.
- 40 Por ejemplo, según un modo de realización, el cultivo de las cepas del género *Chlorella* se ilumina con una luz variable, en donde la intensidad de la luz varía entre 50 y  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 30 veces por hora.
- Por ejemplo, según un modo de realización, el cultivo de las cepas del género *Haematococcus* se ilumina con una luz variable, en donde la intensidad de la luz varía entre 100 y 150  $\mu\text{E}$ , 60 veces por hora.
- 45 Por ejemplo, según un modo de realización, el cultivo de las cepas del género *Nitzschia* se ilumina con destellos de una intensidad de 200  $\mu\text{E}$ , 30 veces por hora.
- 50 Tal y como está descrito para la intensidad luminosa más arriba y según un modo de la invención, la cantidad de luz aportada al cultivo por hora puede variar en función de la densidad celular. En el estadio inicial del cultivo, cuando la densidad celular es de  $10^5$  y  $5 \times 10^5$  células por mililitro, el aporte total de luz por hora está por lo general comprendido entre aproximadamente 1 500 y 8 000, preferiblemente 1 500 y 6 000  $\mu\text{mol m}^{-2}$ , aún más preferiblemente entre 2 000 y 5 000  $\mu\text{mol m}^{-2}$ . Cuando el cultivo alcanza una densidad entre  $10^6$  y  $10^7$  células por mililitro, el aporte total de luz por hora puede aumentarse hasta entre 6 000 y 67 000  $\mu\text{mol m}^{-2}$ , preferiblemente entre 6 000 y 50 000, y aún más preferiblemente entre 12 000 y 45 000  $\mu\text{mol m}^{-2}$ , por ejemplo. En el estadio final del cultivo, con una densidad celular entre  $10^7$  y  $10^8$  células por mililitro, el aporte total de luz por hora puede aumentarse hasta entre 45 000 y 300 000, por ejemplo, preferiblemente, entre 45 000 y 200 000  $\mu\text{mol m}^{-2}$  y, por ejemplo, aún más preferiblemente entre 50 000 y 150 000  $\mu\text{mol m}^{-2}$ .
- 55 En el estadio final del cultivo (a una densidad celular entre  $10^7$  y  $10^8$  células por mililitro), el cultivo está iluminado con

30 destellos por hora, en donde cada destello tiene una duración de 30 segundos y una intensidad entre 50 y 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , lo que da un aporte total de luz por hora de 45 000 a 135 000  $\mu\text{mol m}^{-2}$ .

Según un modo de la invención, por ejemplo, cuando la duración de los destellos es, por ejemplo, de menos de un minuto, o menos de un segundo, en el estadio inicial del cultivo (a una densidad celular entre  $10^5$  y  $5 \times 10^5$  células por mililitro), el cultivo está iluminado con 30 destellos por hora, en donde cada destello tiene una duración de 10 segundos y una intensidad entre 50 y 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , lo que da un aporte total de luz por hora de 15 000  $\mu\text{mol m}^{-2}$  a 30 000  $\mu\text{mol m}^{-2}$ . A continuación, en el estadio intermedio (a una densidad celular entre  $10^6$  y  $10^7$  células por mililitro), el cultivo está iluminado con 50 destellos por hora, en donde cada destello tiene una duración de 10 segundos y una intensidad entre 200 y 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , lo que da un aporte total de luz por hora de 100 000 a 150 000  $\mu\text{mol m}^{-2}$ . Luego, en el estadio final del cultivo (a una densidad celular entre  $10^7$  y  $10^8$  células por mililitro), el cultivo está iluminado con 120 destellos por hora, en donde cada destello tiene una duración de 10 segundos y una intensidad entre 350 y 450  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , lo que da un aporte total de luz por hora de 420 000 a 540 000  $\mu\text{mol m}^{-2}$ .

El aporte de luz en los cultivos se puede obtener gracias a las fuentes de luz repartidas alrededor de la pared externa de los fermentadores. Un reloj enciende estas lámparas en los momentos de iluminación definidos. Según un modo de realización preferido, la iluminación de los cultivos de la etapa a) y/o b) está asegurada por un dispositivo de iluminación interno del fermentador. Así pues, la eficacia de la iluminación es mejor con respecto a una configuración en la que la luz penetra por claraboyas a partir de las fuentes dispuestas en el exterior. Los dispositivos de iluminación se pueden disponer por todo el conjunto giratorio provisto de paletas o de piezas tubulares que se hundan en la masa a tratar, o incluso en el fondo o en el tope del tanque. Según un modo de realización preferido de la invención, el dispositivo de iluminación está situado sobre cada paleta opuesta en el interior del fermentador. Tal dispositivo está descrito en la solicitud de patente francesa n.º 1353641. El fermentador también está dotado de numerosas fuentes de iluminación colocadas en cada paleta opuesta, cuya función es la de impedir la formación de un vórtice en el seno de la biomasa bajo la acción del conjunto giratorio mezclador. Estas fuentes de iluminación están preferiblemente encapsuladas, de manera parcial o completa en al menos una parte de estas paletas opuestas, en una materia compatible con la biomasa y con un grosor que permite difundir dicha luz hacia el interior del tanque.

Un material particularmente bien adaptado es la polisulfona que combina una buena compatibilidad con las normas alimentarias (incluidas las normas estadounidenses de la Agencia de Alimentos y Medicamentos o FDA), un buen coeficiente de transferencia térmica (que permite la evacuación del calor hacia la masa de microorganismos) y un carácter semitransparente que permite una buena transmisión de la luz, si el material tiene un grosor elegido entre 1 mm y 5 cm; además, este material conserva sus propiedades después de un posible tratamiento térmico de esterilización o de limpieza con detergentes o con ácido. Si se modifica la combinación de características deseadas, se pueden elegir otros materiales, por ejemplo, el poliuretano, el polipropileno, un material acrílico o un policarbonato.

Preferiblemente, las fuentes de iluminación son diodos electroluminiscentes (LED, por su nombre en inglés); se trata de fuentes de luz bien controladas, tanto en su puesta en práctica como en sus aplicaciones. Tales fuentes pueden tener espectros de emisión muy diversos, ya que hay LED blancos (que simulan la luz solar), pero también LED con reducción de la gama espectral (por ejemplo, centrados en una luz roja, azul o verde). Tales fuentes de iluminación generan menos calor que las bombillas o las lámparas; tienen además unas dimensiones suficientemente pequeñas para poderlas implantar sobre la superficie de cada paleta opuesta sin inducir un grosor adicional que perjudique la función principal de estas placas.

Las fuentes de iluminación pueden tener pautas de programación (se habla también de pautas de control o de pilotaje) muy variadas.

El procedimiento según la invención tiene la ventaja de aumentar el rendimiento de la biomasa obtenida del cultivo. Este procedimiento tiene también la ventaja de acrecentar la acumulación de las moléculas de interés. Se pueden citar a modo de ejemplos de estas moléculas de interés los alcoholes, entre los cuales los alcoholes primarios, los alcoholes secundarios, los ésteres de alcoholes y los alcoholes grasos, los ácidos grasos (AG), entre los cuales los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), los ácidos grasos de cadena larga (AGCL), los ácidos grasos de cadena muy larga (AGCML), los ácidos grasos saturados, los ácidos grasos insaturados o poliinsaturados, los ácidos grasos ramificados con funciones polares o apolares, los ácidos grasos hidroxilados, los ésteres de ácidos grasos y los ácidos grasos de cadena alifática *iso*, los lípidos entre los cuales los glucolípidos, los gliceroglucolípidos, los fosfolípidos o los glicerofosfolípidos, los lípidos de cadenas largas, los esfingolípidos, los esteroides o los ésteres cerosos, los lípidos insaponificables, tales como los terpenos, los esteroides (entre los cuales los esteroides: fitoesteroides, colesterol, vitamina D y otras vitaminas) y las prostaglandinas, los ésteres, los alcanos, los alquenos, los aldehídos, las cetonas, los ácidos orgánicos, los antioxidantes, los polisacáridos, los pigmentos, los aminoácidos, los MAA, los polímeros pseudopeptídicos de aminoácidos, tales como la cianoficina, las enzimas o las vitaminas, los antibióticos, los compuestos con actividad farmacológica, las toxinas, las proteínas exógenas o recombinantes, los compuestos orgánicos como los ácidos, las moléculas utilizables como biocombustibles, los terpenos tales como los botriococenos, o los productos intermedios se pueden convertir en combustible. También se pueden citar las moléculas utilizadas para fabricar bioplásticos, tales como el hidroxibutirato (PHB).

En particular, este procedimiento tiene la ventaja de enriquecer las células así cultivadas en ácidos grasos poliinsaturados, más en concreto en el ácido eicosapentaenoico (EPA) y/o ácido docosahexaenoico (DHA) y/o en el

ácido araquidónico (ARA), y/o en el ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA), y/o en el ácido linoleico, y/o en el ácido oleico, y/o en carotenoides, más en concreto, en luteína, cantaxantina, astaxantina, fucoxantina, zeaxantina, equinonona,  $\beta$ -caroteno y fenicoxantina.

5 Los tipos celulares que se pueden cultivar según el procedimiento descrito en esta invención, preferiblemente según los modos de realización que comprenden la etapa b) en modo mixótrofo, corresponden a todos los organismos unicelulares fotosensibles, eucariotas, capaces de crecer en cultivo mixótrofo. Además, es deseable que la capacidad de crecer en mixotrofia permita alcanzar productividades de biomasa o de moléculas de interés compatibles con una explotación industrial. Por «fotosensible» se entienden las células capaces de inducir una actividad metabólica en respuesta a una iluminación natural o artificial, en las condiciones de mixotrofia. Esta actividad metabólica puede ser, por ejemplo, una actividad de fotosíntesis o la síntesis de un pigmento.

10 Las células que se pueden poner en cultivo en el procedimiento según la invención, preferiblemente según los modos de realización que comprenden la etapa b) en modo mixótrofo, se pueden elegir entre las células eucariotas fotosensibles que se aíslan a partir de un organismo pluricelular animal, vegetal o fúngico, o los organismos eucariotas unicelulares fotosensibles.

15 Como microorganismos eucariotas, se pueden citar, sin limitación, los protistas, las levaduras, marinos y de agua dulce. Estos microorganismos pueden ser fotosintéticos o no. Entre los protistas no fotosintéticos se citarán, en particular, los de la clase *Labyrinthulomycete*, en particular del género *Schizochytrium* o *Aurantiochytrium*, que se cultivan en mixotrofia para la producción simultánea del ácido docosahexaenoico (DHA) y de pigmentos carotenoides tales como la astaxantina o la cantaxantina. El protista *Nitzschia brevirostris* es un microorganismo eucariota fotosintético que se cultiva en mixotrofia para la producción simultánea del ácido eicosapentaenoico (EPA) y de pigmentos carotenoides. Otros microorganismos eucariotas fotosensibles como las levaduras pueden igualmente cultivarse con ayuda del procedimiento según la invención, preferiblemente según los modos de realización que comprenden la etapa a) y/o b) en modo mixótrofo.

25 Como células eucariotas fotosensibles se pueden utilizar también, por ejemplo, las células eucariotas aisladas a partir de un organismo pluricelular y capaces de crecer en cultivo mixótrofo. Este tipo de organismo puede ser fúngico, animal o vegetal. El aporte de luz durante las fases de crecimiento y de producción permite mantener la actividad fotosintética o un metabolismo fotoactivado, como por ejemplo la activación de la vía de biosíntesis de un pigmento inducido por la luz. Entre las células eucariotas procedentes de organismos pluricelulares, se pueden citar en particular las células vegetales indiferenciadas procedentes de callos que se mantienen en este estado por la adición de hormonas vegetales en el medio de cultivo; o incluso las células animales que han sido tratadas mediante un procedimiento de inmortalización que permite el cultivo *in vitro*.

30 Los protistas mixótrofos de interés que pueden ponerse en práctica en el procedimiento según la invención pueden, por ejemplo, seleccionarse entre las especies de los géneros siguientes: *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, *Odontella*, *Phaeodactylum*, *Nannochloris*, *Cryptocodinium*, *Monodus*, *Nannochloropsis*, *Isochrysis*, *Euglena*, *Cyclotella*, *Nitzschia*, *Aurantiochytrium*, *Scenedesmus* y/o *Tetraselmis*, *Chlorella* y *Haematococcus*.

35 Según un aspecto preferido, los protistas de interés se eligen entre las especies de los géneros *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, *Odontella*, *Phaeodactylum*, *Nannochloris*, *Cryptocodinium*, *Monodus*, *Nannochloropsis*, *Isochrysis*, *Euglena*, *Cyclotella*, *Nitzschia*, *Aurantiochytrium*, *Scenedesmus* y en particular entre las especies de los géneros *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, *Odontella*, *Phaeodactylum*, *Nannochloris*, *Cryptocodinium*, *Monodus*, *Nannochloropsis*, *Chlorella* y *Haematococcus*.

40 En cuanto a los carotenoides, los protistas siguientes son particularmente ventajosos: *Schizochytrium* (astaxantina), *Nitzschia* (fucoxantina), *Aurantiochytrium* (cantaxantina o astaxantina) y *Scenedesmus* (luteína).

45 En las tablas 3A y 3B se indican las nuevas cepas identificadas por los inventores, que se han depositado en la CCAP (Colección de cultivos de algas y protozoos, Asociación Escocesa para la Ciencia Marina, Dunstaffnage Marine Laboratory, Oban, Argyll PA371QA, Escocia, Reino Unido) el 8 de julio de 2014, según las disposiciones del Tratado de Budapest, con los números de acceso de la CCAP indicados en estas tablas. Las moléculas producidas por las cepas también están indicadas.

50 Estos géneros forman dos grupos: el grupo 1 está formado por las cepas que pertenecen a los géneros *Schizochytrium*, *Aurantiochytrium* y *Cryptocodinium*. Estos protistas no tienen cloroplastos y, por lo tanto, se dice que son «no fotosintéticos». *Schizochytrium* y *Aurantiochytrium* son hongos unicelulares, y *Cryptocodinium* es un heterótrofo flagelado. Los ejemplos de estos géneros se ofrecen en la tabla 3A que viene más adelante y se indican mediante el grupo 1. Según un modo de realización, el procedimiento de la invención contempla el cultivo de los géneros *Schizochytrium*, *Aurantiochytrium* y *Cryptocodinium*.

55 El segundo grupo, el grupo 2, está constituido por las cepas que son fotosintéticas, es decir, que tienen cloroplastos. Estos géneros de protistas *Tetraselmis*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Nitzschia* y *Haematococcus* se clasifican como microalgas. Según un modo de realización, el procedimiento de la invención contempla el cultivo de los géneros *Tetraselmis*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Nitzschia* y *Haematococcus*.

**Grupo 1**

Cepas	N.º de depósito de la CCAP	Molécula de interés
<i>Schizochytrium</i> sp. FCC 36	CCAP 4087/3	DHA, astaxantina
<i>Schizochytrium</i> sp. FCC1320	CCAP 4087/4	DHA, astaxantina
<i>Schizochytrium</i> sp. FCC1491	CCAP 4087/5	DHA, astaxantina
<i>Aurantiochytrium mangrovei</i> FCC 1311	CCAP 4062/3	DHA, cantaxantina, astaxantina
<i>Aurantiochytrium mangrovei</i> FCC 31	CCAP 4062/2	DHA, cantaxantina, astaxantina
<i>Aurantiochytrium mangrovei</i> FCC 1319	CCAP 4062/4	DHA, cantaxantina, astaxantina
<i>Aurantiochytrium mangrovei</i> FCC 1479	CCAP 4062/6	DHA, cantaxantina, astaxantina
<i>Aurantiochytrium mangrovei</i> FCC 1325	CCAP 4062/5	DHA, cantaxantina, astaxantina
<i>Crypthecodinium cohnii</i> FCC 30	CCAP 1104/3	DHA, carotenoides ( $\beta$ -caroteno)
<i>Crypthecodinium cohnii</i> FCC 1384	CCAP 1104/5	DHA, carotenoides ( $\beta$ -caroteno)
<i>Crypthecodinium cohnii</i> FCC 1348	CCAP 1104/4	DHA, carotenoides ( $\beta$ -caroteno)

Tabla 3A: Ejemplos de las cepas que se pueden poner en práctica según el procedimiento de la invención. Estas cepas son protistas denominados no fotosintéticos, es decir, que no tienen cloroplastos. Según un modo de realización, el procedimiento de la invención contempla el cultivo de lo que pertenece a los géneros *Schizochytrium*, *Aurantiochytrium* y *Crypthecodinium*.

5

**Grupo 2**

Cepas	N.º de depósito de la CCAP	Molécula de interés
<i>Tetraselmis</i> sp. FCC 1563	CCAP 66/85	EPA, ALA
<i>Scenedesmus abundans</i> FCC 23	CCAP 276/78	ALA, ácido oleico, luteína
<i>Scenedesmus</i> sp. FCC 1483	CCAP 276/79	ALA, ácido oleico, luteína
<i>Scenedesmus obliquus</i> FCC 4	CCAP 276/77	ALA, ácido oleico, luteína
<i>Chlorella sorokiniana</i> FCC 2	CCAP 211/129	Luteína
<i>Chlorella</i> sp. FCC 1553	CCAP 211/130	Luteína
<i>Chlorella</i> sp. FCC 1520	CCAP 211/131	Luteína
<i>Nitzschia</i> sp. FCC 1687	CCAP 1052/22	EPA, fucoxantina
<i>Haematococcus</i> sp. FCC 1643	CCAP 34/18	Astaxantina

Tabla 3B: Ejemplos de las cepas que se pueden poner en práctica según el procedimiento de la invención. Estas cepas son microalgas denominadas fotosintéticas, es decir, que tienen cloroplastos. Estos géneros son microalgas. Según un modo de realización, el procedimiento de la invención contempla el cultivo de los géneros *Tetraselmis*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Nitzschia* y *Haematococcus*.

10

Se describen también las nuevas cepas de las tablas 3A y 3B. Estas cepas se han seleccionado por su carácter mixótrofo y por su alto rendimiento en ácidos grasos y/o carotenoides, sobre todo de luteína, fucoxantina, astaxantina,

cantaxantina y  $\beta$ -caroteno, y sobre todo por su capacidad para ser cultivadas con un aporte de luz superior a 10  $\mu$ E, en un medio rico en elementos orgánicos. Estos medios los conoce el experto en la técnica.

El procedimiento del cultivo según la invención se puede aplicar también a cualquier especie del género *Schizochytrium*, *Aurantiochytrium*, *Crypthecodinium*, *Tetraselmis*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Nitzschia* y *Haematococcus* capaz de crecer en las condiciones de mixotrofia según la invención, y capaz de producir ácidos grasos y/o carotenoides.

Cuando las microalgas son del género *Chlorella*, se podrán elegir entre las especies *C. acuminata*, *C. angustelloidoides*, *C. anitrata*, *C. antarctica*, *C. aureoviridis*, *C. autotrophica*, *C. botryoides*, *C. caldaria*, *C. candida*, *C. capsulata*, *C. chlorelloides*, *C. cladoniae*, *C. coelastroides*, *C. colonialis*, *C. communis*, *C. conductrix*, *C. conglomerata*, *C. desiccata*, *C. ellipsoidea*, *C. elongata*, *C. emersonii*, *C. faginea*, *C. fusca*, *C. glucotropha*, *C. homospaera*, *C. infusionum*, *C. kessleri*, *C. koettlitzii*, *C. lacustris*, *C. lewinii*, *C. lichina*, *C. lobophora*, *C. luteo-viridis*, *C. marina*, *C. miniata*, *C. minor*, *C. minutissima*, *C. mirabilis*, *C. mucosa*, *C. mutabilis*, *C. nocturna*, *C. nordstedtii*, *C. oblonga*, *C. oocystoides*, *C. ovalis*, *C. paramecii*, *C. parasitica*, *C. parva*, *C. peruviana*, *C. photophila*, *C. pituita*, *C. pringsheimii*, *C. protothecoides*, *C. pulchelloides*, *C. pyrenoidosa*, *C. regularis*, *C. reisiglii*, *C. reniformis*, *C. rotunda*, *C. rubescens*, *C. rugosa*, *C. saccharophila*, *C. salina*, *C. simplex*, *C. singularis*, *C. sorokiniana*, *C. spaerckii*, *C. sphaerica*, *C. stigmatophora*, *C. subsphaerica*, *C. terricola*, *C. trebouxioides*, *C. vannielii*, *C. variabilis*, *C. viscosa*, *C. volutis*, *C. vulgaris*, *C. zopfingiensis*. Ventajosamente, según la invención, las algas del género *Chlorella* podrán ser algas elegidas entre las especies *C. sorokiniana* o *C. vulgaris*.

Cuando las microalgas son del género *Scenedesmus*, se podrán elegir entre las especies *S. abundans*, *S. aciculatus*, *S. aculeolatus*, *S. aculeotatus*, *S. acuminatus*, *S. acutiformis*, *S. acutus*, *S. aldavei*, *S. alternans*, *S. ambuehlii*, *S. anhuiensis*, *S. anomalus*, *S. antennatus*, *S. antillarum*, *S. apicaudatus*, *S. apiculatus*, *S. arcuatus*, *S. aristatus*, *S. armatus*, *S. arthrodesmiformis*, *S. arvernensis*, *S. asymmetricus*, *S. bacillaris*, *S. baculiformis*, *S. bajacalifornicus*, *S. balatonicus*, *S. basiliensis*, *S. bernardii*, *S. bicaudatus*, *S. bicellularis*, *S. bidentatus*, *S. bijuga*, *S. bijugatus*, *S. bijugus*, *S. brasiliensis*, *S. breviaculeatus*, *S. brevispina*, *S. caribeanus*, *S. carinatus*, *S. caudato-aculeolatus*, *S. caudatus*, *S. chlorelloides*, *S. circumfusus*, *S. coalitus*, *S. costatogranulatus*, *S. crassidentatus*, *S. curvatus*, *S. decorus*, *S. denticulatus*, *S. deserticola*, *S. diagonalis*, *S. dileticus*, *S. dimorphus*, *S. disciformis*, *S. dispar*, *S. distentus*, *S. ecornis*, *S. ellipsoideus*, *S. ellipticus*, *S. falcatus*, *S. fenestratus*, *S. flavescens*, *S. flexuosus*, *S. furcosus*, *S. fuscus*, *S. fusiformis*, *S. gracilis*, *S. graevenitzii*, *S. grahneisii*, *S. granulatus*, *S. gujaratensis*, *S. gutwinski*, *S. hanleyi*, *S. helveticus*, *S. heteracanthus*, *S. hindakii*, *S. hirsutus*, *S. hortobagyi*, *S. houlensis*, *S. huangshanensis*, *S. hystrix*, *S. incrassatus*, *S. indianensis*, *S. indicus*, *S. inermis*, *S. insignis*, *S. intermedius*, *S. javanensis*, *S. jova*, *S. jugalis*, *S. kerguelensis*, *S. kissii*, *S. komarekii*, *S. lefevrei*, *S. linearis*, *S. littoralis*, *S. longispina*, *S. longus*, *S. luna*, *S. lunatus*, *S. magnus*, *S. maximus*, *S. microspina*, *S. minutus*, *S. mirus*, *S. morzinensis*, *S. multicauda*, *S. multiformis*, *S. multispina*, *S. multistriatus*, *S. naegeli*, *S. nanus*, *S. notatus*, *S. nygaardii*, *S. oahuensis*, *S. obliquus*, *S. obtusiusculus*, *S. obtusus*, *S. olvalternus*, *S. oocystiformis*, *S. opoliensis*, *S. ornatus*, *S. ovalternus*, *S. pannonicus*, *S. papillosum*, *S. parisiensis*, *S. parvus*, *S. peccensis*, *S. pectinatus*, *S. perforatus*, *S. planctonicus*, *S. plarydiscus*, *S. platydiscus*, *S. pleiomorphus*, *S. polessicus*, *S. polydenticulatus*, *S. polyglobulus*, *S. polyspinosus*, *S. praetervisus*, *S. prismaticus*, *S. producto-capitatus*, *S. protuberans*, *S. pseudoarmatus*, *S. pseudobernardii*, *S. pseudodenticulatus*, *S. pseudogranulatus*, *S. pseudohystrix*, *S. pyrus*, *S. quadrialatus*, *S. quadricauda*, *S. quadricaudata*, *S. quadricaudus*, *S. quadrispina*, *S. raciborskii*, *S. ralfsii*, *S. reginae*, *S. regularis*, *S. reniformis*, *S. rostrato-spinosus*, *S. rotundus*, *S. rubescens*, *S. scenedesmoides*, *S. schneppfii*, *S. schroeteri*, *S. securiformis*, *S. semicristatus*, *S. semipulcher*, *S. sempervirens*, *S. senilis*, *S. serrato-perforatus*, *S. serratus*, *S. serrulatus*, *S. setiferus*, *S. sihensis*, *S. smithii*, *S. soli*, *S. sooi*, *S. spicatus*, *S. spinoso-aculeolatus*, *S. spinosus*, *S. spinulatus*, *S. striatus*, *S. subspicatus*, *S. tenuispina*, *S. terrestris*, *S. tetradesmiformis*, *S. transilvanicus*, *S. tricostatus*, *S. tropicus*, *S. tschudyi*, *S. vacuolatus*, *S. variabilis*, *S. vellitaris*, *S. verrucosus*, *S. vesiculosus*, *S. westii*, *S. weberi*, *S. wisconsinensis*, *S. wuhanensis*, *S. wuhuensis*. Ventajosamente, según la invención, las algas del género *Scenedesmus* podrán ser algas elegidas entre las especies *S. obliquus* o *S. abundans*.

Cuando las microalgas son del género *Nitzschia*, *N. abbreviata*, *N. abonensis*, *N. abridia*, *N. accedens*, *N. accommodata*, *N. aciculariformis*, *N. acicularioides*, *N. acicularis* (comprendidas todas sus variedades), *N. acidoclinata*, *N. actinastroides*, *N. actydropihila*, *N. acula*, *N. acuminata* (comprendidas todas sus variedades), *N. acuta*, *N. adamata*, *N. adamatoides*, *N. adapta*, *N. adducta*, *N. adductoides*, *N. admissa*, *N. admissoides*, *N. aequalis*, *N. aequatorialis*, *N. aequora*, *N. aequorea*, *N. aerophila*, *N. aerophiloides*, *N. aestuari*, *N. affinis*, *N. africana*, *N. agnewii*, *N. agnita*, *N. alba*, *N. albicostalis*, *N. alexandrina*, *N. alicae*, *N. allanssonii*, *N. alpina*, *N. alpinobacillum*, *N. amabilis*, *N. ambigua*, *N. americana*, *N. amisaensis*, *N. amphibia*, *N. amphibia* (comprendidas todas sus variedades), *N. amphibioides*, *N. amphicephala*, *N. amphilepta*, *N. amphioxoides*, *N. amphioxys* (comprendidas todas sus variedades), *N. amphiplectans*, *N. amphiprora*, *N. amplexans*, *N. amundonii*, *N. anassae*, *N. andicola*, *N. angularis* (comprendidas todas sus variedades), *N. angulata*, *N. angustata* (comprendidas todas sus variedades), *N. angustata*, *N. angustiforaminata*, *N. aniae*, *N. antarctica*, *N. antillarum*, *N. apiceonica*, *N. apiculata*, *N. archibaldii*, *N. arcuata*, *N. arcula*, *N. arcus*, *N. ardua*, *N. aremonica*, *N. arenosa*, *N. areolata*, *N. armoricana*, *N. asperula*, *N. astridiae*, *N. atomus*, *N. attenuata*, *N. aurantiaca*, *N. aurariae*, *N. aurica*, *N. auricula*, *N. australis*, *N. austriaca*, *N. bacata* (comprendidas todas sus variedades), *N. bacillariaeformis*, *N. bacilliformis*, *N. bacillum*, *N. balatonis*, *N. balcanica*, *N. baltica*, *N. barbieri* (comprendidas todas sus variedades), *N. barkleyi*, *N. barronii*, *N. barrowiana*, *N. bartholomei*, *N. bathurstensis*, *N. bavaria*, *N. behrei*, *N. bergii*, *N. beyeri*, *N. biacricula*, *N. bicapitata* (comprendidas todas sus variedades), *N. bicuneata*, *N. bifurcata*, *N. bilobata* (comprendidas todas sus variedades), *N. birostrata*, *N. bisculpta*, *N. bita*, *N. bizertensis*, *N. blankaartensis*, *N. bombiformis*, *N. borealis*, *N. bosumtwiensis*, *N. braarudii*, *N. brebissonii* (comprendidas todas sus

variedades), *N. bremensis* (comprendidas todas sus variedades), *N. brevior*, *N. brevirostris*, *N. brevissima* (comprendidas todas sus variedades), *N. brevistriata*, *N. brightwellii*, *N. brittonii*, *N. brunoi*, *N. bryophila*, *N. buceros*, *N. bukensis*, *N. bulnheimiana*, *N. buschbeckii*, *N. calcicola*, *N. caledonensis*, *N. calida* (comprendidas todas sus variedades), *N. californica*, *N. campechiana*, *N. capensis*, *N. capitata*, *N. capitellata* (comprendidas todas sus variedades), *N. capuluspalae*, *N. carnibarica*, *N. carnico-barica*, *N. challengerii*, *N. chalonii*, *N. chandolensis*, *N. chardezii*, *N. chasei*, *N. chauhanii*, *N. chungara*, *N. chutteri*, *N. circumscuta*, *N. clarissima*, *N. clausii*, *N. clementei*, *N. clementia*, *N. clevei*, *N. closterium* (comprendidas todas sus variedades), *N. coarctata*, *N. cocconeiformis*, *N. communis* (comprendidas todas sus variedades), *N. commutata*, *N. commutoides*, *N. compacta*, *N. compressa* (comprendidas todas sus variedades), *N. concordia*, *N. confinis*, *N. conformata*, *N. confusa*, *N. congolensis*, *N. constricta* (comprendidas todas sus variedades), *N. consummata*, *N. corpulenta*, *N. costei*, *N. coutei*, *N. cretica*, *N. cucumis*, *N. cursoria*, *N. curta*, *N. curvata*, *N. curvilineata*, *N. curvipunctata*, *N. curvirostris* (comprendidas todas sus variedades), *N. curvula* (comprendidas todas sus variedades), *N. cuspidata*, *N. cylindriciformis*, *N. cylindrus*, *N. dakariensis*, *N. davidsonii*, *N. dealpina*, *N. debilis*, *N. decipiens*, *N. delauneyi*, *N. delicatissima*, *N. delicatula*, *N. delognei*, *N. denticula* (comprendidas todas sus variedades), *N. denticuloides*, *N. desertorum*, *N. diana*, *N. diaphana*, *N. diducta*, *N. didyma*, *N. diatrachii*, *N. dilatata*, *N. diluviana*, *N. dippelii*, *N. directa*, *N. diserta*, *N. disputata*, *N. dissipata* (comprendidas todas sus variedades), *N. dissipatoides*, *N. distans* (comprendidas todas sus variedades), *N. distantoides*, *N. divaricata*, *N. divergens*, *N. diversa*, *N. diversecostata*, *N. doljensis*, *N. draveillensis*, *N. droebakensis*, *N. dubia* (comprendidas todas sus variedades), *N. dubiformis*, *N. dubioides*, *N. ebroicensis*, *N. eglei*, *N. elegans*, *N. elegantula*, *N. elegens*, *N. elliptica*, *N. elongata*, *N. entomon*, *N. epiphytica*, *N. epiphyticoides*, *N. epithemiformis*, *N. epithemoides*, *N. epithemoides* (comprendidas todas sus variedades), *N. epsilon*, *N. erlandssonii*, *N. erosa*, *N. etoshensis*, *N. examinanda*, *N. eximia*, *N. famelica*, *N. fasciculata*, *N. febigeri*, *N. ferox*, *N. ferrazae*, *N. fibula-fissa*, *N. filiformis* (comprendidas todas sus variedades), *N. flexa*, *N. flexoides*, *N. fluminensis*, *N. fluorens*, *N. fluvialis*, *N. fagedii*, *N. fonticola* (comprendidas todas sus variedades), *N. fonticoloides*, *N. fonticula*, *N. fontifuga*, *N. forfica*, *N. formosa*, *N. fossalis*, *N. fossilis*, *N. fragilariiformis*, *N. franconica*, *N. fraudulenta*, *N. frauenfeldii*, *N. frequens*, *N. frickei*, *N. frigida* (comprendidas todas sus variedades), *N. frustuloides*, *N. frustulum* (comprendidas todas sus variedades), *N. fruticosa*, *N. fundi*, *N. fusiformis*, *N. gaarderi*, *N. gaertnerae*, *N. gandersheimensis*, *N. garrensis*, *N. gazellae*, *N. getleri*, *N. getlerii*, *N. gelida* (comprendidas todas sus variedades), *N. geniculata*, *N. gessneri*, *N. gieskesii*, *N. gigantea*, *N. gisela*, *N. glabra*, *N. glacialis* (comprendidas todas sus variedades), *N. glandiformis*, *N. goetzeana* (comprendidas todas sus variedades), *N. gotlandica*, *N. graciliformis*, *N. gracilis* (comprendidas todas sus variedades), *N. gracillima*, *N. graciloides*, *N. gradifera*, *N. graeffii*, *N. grana*, *N. grandis*, *N. granii* (comprendidas todas sus variedades), *N. granulata* (comprendidas todas sus variedades), *N. granulosa*, *N. groenlandica*, *N. grossestriata*, *N. grovei*, *N. gruendleri*, *N. grunowii*, *N. guadalupensis*, *N. guineensis*, *N. guttula*, *N. gyrosigma*, *N. habirshawii*, *N. habishawii*, *N. hadriatica*, *N. halteriformis*, *N. hamburgiensis*, *N. hantzschiana* (comprendidas todas sus variedades), *N. harderi*, *N. harrissonii*, *N. hassiaca*, *N. heidenii*, *N. heimii*, *N. hemistriata*, *N. heteropolica*, *N. heufleriana*, *N. heufleriana* (comprendidas todas sus variedades), *N. hiemalis*, *N. hiengheneana*, *N. hierosolymitana*, *N. hoehnkii*, *N. holastica*, *N. hollerupensis*, *N. holsatica*, *N. hamburghensis*, *N. hudsonii*, *N. hummii*, *N. hungarica* (comprendidas todas sus variedades), *N. hustedti*, *N. hustediana*, *N. hyalina*, *N. hybrida* (comprendidas todas sus variedades), *N. hybridaeformis*, *N. ignorata* (comprendidas todas sus variedades), *N. iltisii*, *N. impressa*, *N. improvisa*, *N. incerta*, *N. incognita*, *N. inconspicua*, *N. incrustans*, *N. incurva* (comprendidas todas sus variedades), *N. indica*, *N. indistincta*, *N. inducta*, *N. inflatula*, *N. ingenua*, *N. inimasta*, *N. innominata*, *N. insecta*, *N. insignis* (comprendidas todas sus variedades), *N. intermedia* (comprendidas todas sus variedades), *N. intermissa*, *N. interrupta*, *N. interruptestriata*, *N. invicta* (comprendidas todas sus variedades), *N. invisita*, *N. iranica*, *N. irregularis*, *N. irremissa*, *N. irrepta*, *N. irresoluta*, *N. irritans*, *N. italica*, *N. janischii*, *N. jelineckii*, *N. johnmartinii*, *N. juba*, *N. jucunda*, *N. jugata* (comprendidas todas sus variedades), *N. jugiformis*, *N. kahlii*, *N. kanakarum*, *N. kanayae*, *N. kavirondoensis*, *N. kerguelensis*, *N. kimberliensis*, *N. kittlii*, *N. kittonii*, *N. knysnensis*, *N. kolaczekii*, *N. kotschyi*, *N. kowiensis*, *N. krachiensis*, *N. krenicola*, *N. kuetzingiana* (comprendidas todas sus variedades), *N. kuetzingii*, *N. kuetzingioides*, *N. kurzeana*, *N. kurzii*, *N. kützingiana* (comprendidas todas sus variedades), *N. labella*, *N. labuensis*, *N. lacrima*, *N. lacunarum*, *N. lacunicola*, *N. lacus-karluki*, *N. lacustris*, *N. lacuum*, *N. laevis*, *N. laevisima*, *N. lagunae*, *N. lagunensis*, *N. lamprocampa* (comprendidas todas sus variedades), *N. lanceola* (comprendidas todas sus variedades), *N. lanceolata* (comprendidas todas sus variedades), *N. lancettula*, *N. lancettuloides*, *N. lange-bertalotii*, *N. latens*, *N. latestriata*, *N. latiuscula*, *N. lauenbergiana*, *N. lauenburgiana*, *N. lecoitei*, *N. leehyi*, *N. legleri*, *N. lehyi*, *N. leistikowii*, *N. lesbia*, *N. lesinensis*, *N. lesothensis*, *N. leucosigma*, *N. levidensis* (comprendidas todas sus variedades), *N. liebethuthii* (comprendidas todas sus variedades), *N. ligowskii*, *N. limicola*, *N. limulus*, *N. linearis* (comprendidas todas sus variedades), *N. lineata*, *N. lineola*, *N. linkei*, *N. lionella*, *N. littoralis* (comprendidas todas sus variedades), *N. littorea*, *N. longa*, *N. longicollum*, *N. longirostris*, *N. longissima* (comprendidas todas sus variedades), *N. lorenziana* (comprendidas todas sus variedades), *N. lucisensibilis*, *N. lunaris*, *N. lunata*, *N. lurida*, *N. luzonensis*, *N. macaronensis*, *N. macedonica*, *N. macera*, *N. machardyae*, *N. macilenta* (comprendidas todas sus variedades), *N. magnacarina*, *N. mahihaensis*, *N. mahoodii*, *N. maillardii*, *N. major*, *N. majuscula* (comprendidas todas sus variedades), *N. makarova*, *N. manca*, *N. manca*, *N. mancoides*, *N. manguini*, *N. marginata*, *N. marginulata* (comprendidas todas sus variedades), *N. marina*, *N. martiana*, *N. maxima*, *N. media*, *N. medioconstricta*, *N. mediocris*, *N. mediterranea*, *N. metzeltinii*, *N. microcephala* (comprendidas todas sus variedades), *N. migrans*, *N. minuta*, *N. minutissima*, *N. minutula*, *N. miramarensis*, *N. miserabilis*, *N. mitchelliana*, *N. modesta*, *N. moissacensis* (comprendidas todas sus variedades), *N. mollis*, *N. monachorum*, *N. monoensis*, *N. montanestrus*, *N. morosa*, *N. multistriata*, *N. nana*, *N. natalensis*, *N. natans*, *N. nathorstii*, *N. navicularis*, *N. navis-varingica*, *N. navrongensis*, *N. neglecta*, *N. nelsonii*, *N. neocaledonica*, *N. neoconstricta*, *N. neofrigida*, *N. neogena*, *N. neotropica*, *N. nereidis*, *N. nicobarica*, *N. nienhuisii*, *N. normannii*, *N. notabilis*, *N. nova*, *N. novae-guineensis*, *N. novae-guineensis*, *N. novaehollandiae*, *N. nova-zealandia*, *N. nyassensis*, *N. oberheimiana*, *N. obesa*, *N. obliquecostata*, *N. obscura*, *N. obscurepunctata*, *N. obsidialis*, *N.*

*obsoleta*, *N. obsoletiformis*, *N. obtusa* (comprendidas todas sus variedades), *N. obtusangula*, *N. oceanica*, *N. ocellata*, *N. oliffi*, *N. omega*, *N. osmophila*, *N. ossiformis*, *N. ostentfeldii*, *N. ovalis*, *N. paaschei*, *N. pacifica*, *N. palacea*, *N. palea* (comprendidas todas sus variedades), *N. paleacea*, *N. paleaeformis*, *N. paleoides*, *N. palustris*, *N. pamirensis*, *N. panduriformis* (comprendidas todas sus variedades), *N. pantocsekii*, *N. paradoxa* (que comprende todas estas variedades), *N. parallela*, *N. pararostrata*, *N. partita*, *N. parvula* (comprendidas todas sus variedades), *N. parvuloides*, *N. paxillifer*, *N. peisonis*, *N. pelagica*, *N. pellucida*, *N. pennata*, *N. peragallii*, *N. perindistincta*, *N. perminuta*, *N. perpusilla* (comprendidas todas sus variedades), *N. perspicua*, *N. persuadens*, *N. pertica*, *N. perversa*, *N. petitiana*, *N. philippinarum*, *N. pilum*, *N. pinguescens*, *N. piscinarum*, *N. plana* (comprendidas todas sus variedades), *N. planctonica*, *N. plicatula*, *N. plioveterana*, *N. polaris*, *N. polymorpha*, *N. ponciensis*, *N. praecurta*, *N. praefossilis*, *N. praereinholdii*, *N. princeps*, *N. procera*, *N. prolongata* (comprendidas todas sus variedades), *N. prolongatoides*, *N. promare*, *N. propinqua*, *N. pseudepiphytica*, *N. pseudoamphioxoides*, *N. pseudoamphioxys*, *N. pseudoamphioxys*, *N. pseudoatomus*, *N. pseudobacata*, *N. pseudocapitata*, *N. pseudocarinata*, *N. pseudocommunis*, *N. pseudocylindrica*, *N. pseudodelicatissima*, *N. pseudofonticola*, *N. pseudohungarica*, *N. pseudohybrida*, *N. pseudonana*, *N. pseudoseriata*, *N. pseudosigma*, *N. pseudosinuata*, *N. pseudostagnorum*, *N. pubens*, *N. pulcherrima*, *N. pumila*, *N. punctata* (comprendidas todas sus variedades), *N. pungens* (comprendidas todas sus variedades), *N. pungiformis*, *N. pura*, *N. puriformis*, *N. pusilla* (comprendidas todas sus variedades), *N. putrida*, *N. quadrangula*, *N. quickiana*, *N. rabenhorstii*, *N. radícula* (comprendidas todas sus variedades), *N. rautenbachiae*, *N. recta* (comprendidas todas sus variedades), *N. rectiformis*, *N. rectilonga*, *N. rectirobusta*, *N. rectissima*, *N. regula*, *N. reimeri*, *N. reimerii*, *N. reimerseni*, *N. retusa*, *N. reversa*, *N. rhombica*, *N. rhombiformis*, *N. rhopalodioides*, *N. richterae*, *N. rígida* (comprendidas todas sus variedades), *N. ritscheri*, *N. robusta*, *N. rochensis*, *N. rolandii*, *N. romana*, *N. romanoides*, *N. romanowiana*, *N. rorida*, *N. rosenstockii*, *N. rostellata*, *N. rostrata*, *N. ruda*, *N. rugosa*, *N. rupestris*, *N. rusingae*, *N. ruttneri*, *N. salinarum*, *N. salinicola*, *N. salpaespinosae*, *N. salvadoriana*, *N. sansimoni*, *N. sarcophagum*, *N. scabra*, *N. scalaris*, *N. scaligera*, *N. scalpelliformis*, *N. schoenfeldii*, *N. schwabei*, *N. schweikertii*, *N. scutellum*, *N. selligii*, *N. semicostata*, *N. semirobusta*, *N. separanda*, *N. seriata* (comprendidas todas sus variedades), *N. serpenticola*, *N. serpentiraphe*, *N. serrata*, *N. sibula* (comprendidas todas sus variedades), *N. sigma* (comprendidas todas sus variedades), *N. sigmaformis*, *N. sigmatella*, *N. sigmoidea* (comprendidas todas sus variedades), *N. silica*, *N. silicula* (comprendidas todas sus variedades), *N. siliqua*, *N. similis*, *N. simplex*, *N. simpliciformis*, *N. sinensis*, *N. sinuata* (comprendidas todas sus variedades), *N. smithii*, *N. sociabilis*, *N. socialis* (comprendidas todas sus variedades), *N. solgensis*, *N. solida*, *N. solita*, *N. soratensis*, *N. sp.*, *N. spathulata* (comprendidas todas sus variedades), *N. speciosa*, *N. spectabilis* (comprendidas todas sus variedades), *N. sphaerophora*, *N. spiculoides*, *N. spiculum*, *N. spinarum*, *N. spinifera*, *N. stagnorum*, *N. steenbergensis*, *N. stellata*, *N. steynii*, *N. stimulus*, *N. stoliczkiana*, *N. stompsii* (comprendidas todas sus variedades), *N. strelnikovae*, *N. stricta*, *N. strigillata*, *N. striolata*, *N. subaccommodata*, *N. subacicularis*, *N. subacuta*, *N. subamphioxoides*, *N. subapiculata*, *N. subbacata*, *N. subcapitata*, *N. subcapitellata*, *N. subcohaerens* (comprendidas todas sus variedades), *N. subcommunis*, *N. subconstricta*, *N. subcurvata*, *N. subdenticula*, *N. subfalcata*, *N. subfraudulenta*, *N. subfrequens*, *N. subfrustulum*, *N. subgraciloides*, *N. subinflata*, *N. subinivicta*, *N. sublaevis*, *N. sublanceolata*, *N. sublica*, *N. sublinearis*, *N. sublongirostris*, *N. submarina*, *N. submediocris*, *N. subdiosa*, *N. subpacifica*, *N. subpunctata*, *N. subromana*, *N. subrostrata*, *N. subrostratoides*, *N. subrostroides*, *N. subsalsa*, *N. subtilioides*, *N. subtilis* (comprendidas todas sus variedades), *N. subtubicola*, *N. subvitrea*, *N. suchlandtii*, *N. sulcata*, *N. sundaensis*, *N. supralitorea*, *N. tabellaria*, *N. taenia*, *N. taeniiformis*, *N. tantata*, *N. tarda*, *N. taylorii*, *N. temperei*, *N. tenella*, *N. tenerifa*, *N. tenuiarcuata*, *N. tenuirostris*, *N. tenuis* (comprendidas todas sus variedades), *N. tenuissima*, *N. tergestina*, *N. terrestris*, *N. terricola*, *N. thermalis* (comprendidas todas sus variedades), *N. thermaloides*, *N. tibetana*, *N. tirstrupensis*, *N. tonoensis*, *N. towutensis*, *N. translucida*, *N. tropica*, *N. tryblionella* (comprendidas todas sus variedades), *N. tsarenkoi*, *N. tubicola*, *N. tumida*, *N. turgidula*, *N. turgiduloides*, *N. umaensis*, *N. umbilicata*, *N. umbonata*, *N. vacillata*, *N. vacua*, *N. valdecostata*, *N. valdestrata*, *N. valens*, *N. valga*, *N. valida* (comprendidas todas sus variedades), *N. vanheurckii*, *N. vanoyei*, *N. vasta*, *N. ventricosa*, *N. vermicularioides*, *N. vermicularis* (comprendidas todas sus variedades), *N. vermicularoides*, *N. vexans*, *N. victoriae*, *N. vidovichii*, *N. vildaryana*, *N. villarealii*, *N. virgata*, *N. visurgis*, *N. vitrea* (comprendidas todas sus variedades), *N. vivax* (comprendidas todas sus variedades), *N. vixnegligenda*, *N. vonhauseniae*, *N. vulga*, *N. weaveri*, *N. weissflogii*, *N. westii*, *N. williamsiii*, *N. wiplingeri*, *N. witkowskii*, *N. wodensis*, *N. woltereckii*, *N. woltereckoides*, *N. wuellerstorffii*, *N. wunsamiae*, *N. yunchengensis*, *N. zebuana*, *N. zululandica*.

50 Ventajosamente, según la invención, las algas del género *Nitzschia* podrán ser algas elegidas entre las especies *N. sp.*

Cuando las microalgas son del género *Haematococcus*, se podrán elegir entre las especies *H. allmanii*, *H. buetschlii*, *H. capensis*, *H. carocellus*, *H. droebakensis*, *H. grevillei*, *H. insignis*, *H. lacustris*, *H. murorum*, *H. pluvialis*, *H. salinus*, *H. sanguineis*, *H. thermalis*, *H. zimbabwiensis*.

55 Cuando las microalgas son del género *Aurantiocytrium*, se podrán elegir entre las especies: *A. limacinum*, *A. mangrovei*.

Cuando las microalgas son del género *Schizocytrium*, se podrán elegir entre las especies: *S. aggregatum*, *S. limacinum*, *S. mangrovei*, *S. minutum*, *S. octosporum*.

Cuando las microalgas son del género *Crypthecodinium*, se podrán elegir entre las especies: *C. cohnii*, *C. setense*.

60 Cuando las microalgas son del género *Tetraselmis*, se podrán elegir entre las especies: *T. alacris*, *T. apiculata*, *T. arnoldii*, *T. ascus*, *T. astigmatica*, *T. bichlora*, *T. bilobata*, *T. bolosiana*, *T. chui*, *T. contracta*, *T. convolutae*, *T. cordiformis*, *T. desikacharyi*, *T. elliptica*, *T. fontiana*, *T. gracilis*, *T. hazenii*, *T. helgolandica*, *T. impellucida*, *T. incisa*, *T.*

*inconspicua*, *T. indica*, *T. levis*, *T. maculata*, *T. marina*, *T. mediterranea*, *T. micropapillata*, *T. rubens*, *T. striata*, *T. subcordiformis*, *T. suecica*, *T. tetrabrachia*, *T. tetrathele*, *T. verrucosa*, *T. viridis*, *T. wettsteinii*.

5 El cultivo de hongos filamentosos se puede realizar en los fermentadores aireados y con agitación mecánica, tales como los descritos en la invención. Sin embargo, el cultivo se hace en las condiciones de agitación adaptadas y conocidas por el experto en la técnica, que limita los efectos de cizalla y permite el cultivo de las células en mixotrofia en forma de filamentos o de células aisladas. Se conocen los efectos de la luz sobre el metabolismo de estos organismos, y los metabolitos de interés industrial, tal como los pigmentos, pueden producirse durante el cultivo en mixotrofia [*Folia Microbiol* (Praga) 2 de abril de 2013. «Light regulation on growth, development and secondary metabolism of marine-derived filamentous fungi». Cai M, Fang Z, Niu C, Zhou X, Zhang Y].

10 Los géneros de los hongos que se pueden cultivar son, a modo de ejemplo, *Mortierella alpina* para producir ARA o *Aspergillus niger* para producir ácido cítrico.

15 El protista *Aurantiochytrium* se puede cultivar según el procedimiento de la invención para producir DHA. Preferiblemente, el cultivo se realiza según un modo de realización preferido de la invención, en el cual las etapas a) y b) se hacen en condiciones de mixotrofia. A modo de ejemplo, el cultivo de la cepa *Aurantiochytrium mangrovei* FCC 1324, una cepa aislada por los presentes inventores y depositada en la CCAP (Colección de cultivo de algas y protozoos, Asociación Escocesa para la Ciencia Marina, Dunstaffnage Marine Laboratory, Oban, Argyll PA371QA, Escocia, Reino Unido) según las disposiciones del Tratado de Budapest, con el número de acceso CCAP 4062/1, el 21 de junio de 2013, según el procedimiento de la invención puede permitir la producción de una biomasa rica en DHA y en astaxantina y/o cantaxantina. Dicho DHA puede representar más del 40 % o más del 50 % o más del 60 % de los lípidos totales contenidos en el protista, en donde los carotenoides son ricos en astaxantina y/o cantaxantina y dicha astaxantina y/o cantaxantina puede representar más del 0,1 % o más del 0,15 % o más del 0,2 % en peso sobre el peso total de materia seca. La cepa puede alcanzar un nivel de productividad (cantidad de producto de interés producido por litro de cultivo y por hora) de 0,015 mg/l/h o más de 0,020 mg/l/h o más de 0,025 mg/l/h (véase la tabla 2 del ejemplo 1).

25 El cultivo de las células vegetales se puede contemplar según un modo de realización de la invención como, por ejemplo, suspensiones celulares de la planta ranunculácea *Adonis annua*. Cultivada en mixotrofia, *Adonis annua* es capaz de producir astaxantina y adonirrubina (metabolito intermedio de la biosíntesis de la astaxantina a partir del  $\beta$ -caroteno), que presenta una actividad antioxidante y antitumoral en los humanos.

30 La levadura *Rhodotorula glutinis* presenta un interés industrial por su velocidad de crecimiento, su riqueza en aceite y la síntesis de un pigmento carotenoides, el  $\beta$ -caroteno. El cultivo de *Rhodotorula glutinis* se puede contemplar ya que la iluminación se ha demostrado que es beneficiosa para el crecimiento [Yen H. W., Zhang Z.; *Bioresource Technology*, octubre de 2011, 102 (19): 9279-81] y también para la síntesis de pigmentos [Bhosale P., Gadre R. V.; *Lett Appl Microbiol*. 2002; 34 (5): 349-53]. El cultivo desacoplado permite aplicar parámetros físicoquímicos y/o de iluminación que están orientados hacia el crecimiento de las células, luego en una segunda fase hacia la acumulación de aceite y/o del pigmento de interés.

35 Algunas ventajas de la invención se ilustran en la tabla 5. En la tabla 5 se ilustran los resultados de una comparación para la producción de biomasa de *Aurantiochytrium*, y a continuación la extracción de aceite rico en ácidos grasos polinsaturados según el procedimiento de la invención y los procedimientos discontinuo, semicontinuo y continuo. El procedimiento de la invención (desacoplado) permite combinar las ventajas del modo continuo y semicontinuo (*Fed-Batch*) al limitar las fases de parada de producción para la limpieza y la esterilización de equipo, a la vez que se permite la obtención de una biomasa de composición óptima gracias a la fase de maduración.

Ventajosamente, el procedimiento según el modo de realización de la invención permite, para el cultivo de protistas o de levaduras, la producción de una biomasa que comprende de 40 g/l a 250 g/l de materia seca y, preferiblemente, de más de 80 g/l. Por ejemplo, *Aurantiochytrium* puede producir 150 g/l como algunas bacterias o levaduras.

45 Dicha biomasa de protista puede también comprender un contenido de materia grasa de al menos el 10 %, preferiblemente al menos el 20 %, más preferiblemente al menos el 30 %. Por ejemplo, para *Aurantiochytrium*, el contenido de materia grasa de la biomasa es de al menos el 30 %.

50 Por ejemplo, las cepas del género *Schizochytrium* sp, en condiciones de mixotrofia según un modo de realización de la invención, producen DHA y astaxantina. Dan por lo general un rendimiento de biomasa comprendido entre 80 y 200 g/l, con una tasa de lípidos entre el 30 y el 60 % de la materia seca, en la que el ácido docosahexaenoico (DHA) representa del 40 al 60 %. El rendimiento para la astaxantina es por lo general del 0,01 al 0,2 % de la materia seca. Se puede citar la cepa FCC 36 como ejemplo de estas cepas.

55 Las cepas del género *Aurantiochytrium*, en condiciones de mixotrofia según un modo de realización de la invención, producen DHA y astaxantina y/o cantaxantina. Las cepas dan por lo general un rendimiento de biomasa comprendido entre 80 y 200 g/l, con una tasa de lípidos de aproximadamente el 50 % de la materia seca. El ácido docosahexaenoico (DHA) representa por lo general entre el 15 y el 50 % de los ácidos grasos; la astaxantina y/o la cantaxantina representa(n) por lo general del 0,01 al 0,2 % de la materia seca. Se puede citar como ejemplo de estas cepas las cepas de *Aurantiochytrium mangrovei* FCC 1311, FCC 1319, FCC 1325 y FCC 31.

5 Las cepas del género *Crypthecodinium*, en particular de la especie *Crypthecodinium cohnii*, en condiciones de mixotrofia según un modo de realización de la invención, producen DHA y carotenoides, más en concreto  $\beta$ -caroteno. Las cepas dan por lo general un rendimiento de biomasa comprendido entre 50 y 200 g/l, con una tasa de lípidos entre el 10 y el 30 % de la materia seca. El ácido docosahexaenoico (DHA) representa por lo general entre el 15 y el 50 % de los ácidos grasos y de los carotenoides, más en concreto el  $\beta$ -caroteno, lo que representa entre el 0,01 y el 0,2 % de la materia seca. Se pueden citar como ejemplos de estas cepas las cepas de *Crypthecodinium cohnii* FCC 1384, FCC 1348 y FCC 30.

10 Las cepas del género *Chlorella*, sobre todo *Chlorella* sp. y *Chlorella sorokiniana*, producen luteína. Las cepas permiten producir, en condiciones de mixotrofia según un modo de realización de la invención, por lo general entre 60 g/l y 150 g/l de biomasa, y la luteína con tasas por lo general entre el 0,1 y el 5 % de la materia seca. La biomasa así producida está particularmente bien adaptada a la alimentación de los rotíferos destinados a la piscicultura, en particular para la cría de lubina y de dorada. También se utiliza como nutracéutico por sus propiedades inmunoestimulantes y desintoxicantes. Se pueden citar como ejemplo de estas cepas las cepas de *Chlorella* FCC 2, las cepas de *Chlorella* sp. FCC 1553 y FCC 1520.

15 Las cepas del género *Scenedesmus*, sobre todo las especies *Scenedesmus obliquus*, *Scenedesmus* sp. y *Scenedesmus abundans* en condiciones de mixotrofia según la invención, producen ALA, ácido oleico y luteína. Las cepas dan por lo general un rendimiento de biomasa comprendido entre 30 y 100 g/l, con una tasa de lípidos en general entre el 10 y el 60 % de la materia seca. El ácido  $\alpha$ -linoleico o ALA representa por lo general entre el 10 y el 50 % de los ácidos grasos totales, y el ácido oleico representa por lo general entre el 25 y el 50 % de los ácidos grasos totales, la luteína representa por lo general entre el 0,1 y el 5 % de la materia seca. Se pueden citar como ejemplo de estas cepas las cepas de *Scenedesmus obliquus* FCC 4, *Scenedesmus* sp. FCC 1483 y *Scenedesmus abundans* FCC 23.

20 Las cepas del género *Tetraselmis*, en particular *Tetraselmis* sp, producen en condiciones de mixotrofia, según un modo de realización de la invención, EPA y ALA. Por lo general, las cepas dan un rendimiento de biomasa entre 30 y 80 g/l, con una tasa de ácidos grasos por lo general entre el 10 y el 30 % de la materia seca. El ácido eicosapentaenoico (EPA) representa por lo general entre el 10 y el 25 % de los ácidos grasos, y el ácido  $\alpha$ -linoléico (ALA) por lo general del 5 al 20 % de los ácidos grasos. La biomasa así producida está particularmente bien adaptada para una utilización en acuicultura. Se puede citar como ejemplo de estas cepas la cepa *Tetraselmis* sp. FCC 1563.

25 Las cepas del género *Haematococcus* producen astaxantina en las condiciones de mixotrofia según un modo de realización de la invención. Las cepas dan un rendimiento de biomasa por lo general entre 5 y 30 g/l, y en astaxantina por lo general entre el 0,1 y el 15 % de la materia seca. Se pueden citar como ejemplo de estas cepas la cepa *Haematococcus* sp. FCC 1643.

30 Las cepas del género *Nitzschia* producen, en condiciones de mixotrofia según un modo de realización de la invención, EPA y fucoxantina. Las cepas dan por lo general un rendimiento de biomasa comprendido entre 40 y 120 g/l, un rendimiento de lípidos entre el 10 y el 50 % de la materia seca, de ácido eicosapentaenoico (EPA) entre el 15 y el 50 % de los ácidos grasos, y de fucoxantina entre el 0,1 y el 5 % de la materia seca. Se puede citar como ejemplo de estas cepas la cepa *Nitzschia* sp. FCC 1687.

35 En la presente invención, las cepas que se cultivan en condiciones de mixotrofia, en particular en presencia de una iluminación variable y/o discontinua, sobre todo en forma de destellos, permiten producir las moléculas de interés, en particular los lípidos y/o los pigmentos. De manera general, el cultivo de estas cepas que pertenecen a los géneros *Schizochytrium*, *Aurantiocytrium*, *Crypthecodinium*, *Scenedesmus* y *Nitzschia*, que producen un lípido y un pigmento en las condiciones de heterotrofia, no produce nada de pigmento o lo produce en muy poca cantidad. Además, las cantidades de biomasa obtenidas en modo mixótrofo por estas cepas, según determinados modos de realización de la invención, son iguales o incluso superiores (por ejemplo, aproximadamente superiores del 10 al 18 %) a las cantidades obtenidas en las condiciones de heterotrofia. Por condiciones de heterotrofia se entienden las condiciones de cultivo con un medio de cultivo idéntico, pero en ausencia de luz.

40 La invención tiene así por objeto un procedimiento de cultivo de protistas, en modo de mixotrofia, en particular en presencia de una iluminación variable o discontinua a lo largo del tiempo, por ejemplo en forma de destellos, en particular con vistas a la producción de ácidos grasos polinsaturados o monoinsaturados, y/o carotenoides, en particular la luteína, la fucoxantina, la astaxantina, la cantaxantina y el  $\beta$ -caroteno.

45 Según un aspecto preferido, dicha biomasa comprende un contenido de uno o varios ácidos grasos de interés en la fase grasa de al menos el 10 %, preferiblemente al menos el 20 %, más preferiblemente al menos el 30 %.

Dicha biomasa puede también comprender un contenido de uno o varios pigmentos de interés en la fase grasa de al menos el 0,01 %, preferiblemente al menos el 0,1 %, más preferiblemente al menos el 0,5 %.

50 De manera ventajosa, el procedimiento según la invención comprende además al menos una etapa de recuperación de las moléculas de interés a partir de la biomasa producida. Por ejemplo, el procedimiento según la invención puede comprender además al menos una etapa de recuperación de la materia hidrófoba (que comprende lípidos y/o pigmentos) y, posiblemente, al menos una etapa de extracción de ácidos grasos, en particular de EPA y/o de DHA y/o de ARA y/o de ALA, y/o de ácido oleico y/o al menos una etapa de extracción de pigmentos, en particular luteína,

fucoxantina, astaxantina, zeaxantina, cantaxantina, equinenona,  $\beta$ -caroteno y fenicoxantina, de este material hidrófobo.

La recuperación de las moléculas de interés se puede efectuar mediante los procedimientos convencionales.

5 En particular, cuando dicha molécula de interés es un ácido graso, el procedimiento según la invención comprende posiblemente, además, al menos una etapa de extracción de este ácido graso a partir de dichos lípidos. Los métodos de extracción selectiva de los lípidos, entre los cuales el EPA, el ARA y el DHA son conocidos por el experto en la técnica y se describen, por ejemplo, en Bligh, E. G. y Dyer, W. J. (1959); «A rapid method of total lipid extraction and purification», *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 911-917.

La invención se ilustra de manera no limitante mediante los ejemplos que vienen a continuación.

## Ejemplos

### 10 Ejemplo 1

A continuación se describe la producción de un aceite rico en DHA y en cantaxantina por la cepa FCC 1324 del género *Aurantiochytrium*.

Etapa a):

15 Los cultivos de *Aurantiochytrium* se realizan en fermentadores (biorreactores) de 1 a 2 l útiles con robots especializados que están supervisados por una estación de trabajo. El sistema tiene regulado el pH por la adición de una base (solución de hidróxido de sodio a 2 N) y/o de un ácido (solución de ácido sulfúrico a 1 N). La temperatura de cultivo se fija en 26 °C. La agitación se realiza gracias a 3 elementos móviles para la agitación colocados sobre el árbol según la configuración de Rushton (hélices con tres paletas con bombeo descendente). La presión del oxígeno disuelto se regula en el medio durante todo el transcurso del cultivo, mediante la velocidad de agitación (250-600 rpm), el caudal de aire (0,25-1 vvm), o bien el caudal de oxígeno (0,1-0,5 vvm). Los parámetros de regulación, integrados en el robot con supervisión, permiten mantener una  $pO_2$  constante al 15 %. El biorreactor está equipado con un sistema de iluminación interno fijado sobre cada paleta opuesta. La intensidad, así como los ciclos de luz, están controlados por un robot especializado que está supervisado por una estación de trabajo. El cultivo se ilumina con 60 destellos por hora, en donde cada destello tiene una duración de 20 segundos y una intensidad de 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

25 Los reactores se inoculan con un precultivo realizado sobre una bandeja de agitación (140 rpm) en un recinto termostatzado (26 °C) y con una iluminación entre 100 y 200  $\mu\text{E}$ . Los precultivos y los cultivos de los biorreactores se realizan en el medio Verduyn modificado (sales marinas a 15 g/l,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 3 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 1 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 0,5 g/l,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  a 24 mg/l,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 3 mg/l,  $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 3 mg/l,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 0,04 mg/l,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 10 mg/l, pantotenato a 3,2 mg/l, hidrocloreuro de tiamina a 9,5 mg/l, vitamina B12 a 0,15 mg/l). El sustrato de carbono que se utiliza es glucosa a una concentración entre 60 y 200 g/l.

30 La alimentación en continuo con el medio fresco se realiza con un factor de dilución de aproximadamente 0,08 a 0,15  $\text{h}^{-1}$  y con un medio concentrado entre 10 y 15 veces la concentración inicial de cada elemento. El experto en la técnica sabrá determinar cómo poner en práctica el cultivo continuo y calcular el caudal de alimentación, así como determinar cuando se alcanza el régimen permanente.

35 Una vez que se ha alcanzado el régimen permanente, el trasvase desde este fermentador continuo puede servir para alimentar el fermentador de maduración de la etapa b).

Etapa b):

40 Los cultivos se realizan en fermentadores (biorreactores) de 10 a 20 l útiles con robots especializados que están supervisados por una estación de trabajo. Los sistemas de regulación, al igual que los parámetros de estos últimos, son, en todos los aspectos, similares a los de la etapa a).

45 Los reactores se inoculan con aproximadamente el 50 % del volumen total del cultivo con el trasvase de la etapa a); y, al mismo tiempo, el tanque se alimenta también con el mismo caudal de un medio concentrado 2 veces y que permite obtener la composición final siguiente: sales marinas a 15 g/l; glucosa entre 60 y 120 g/l;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 0,8 g/l;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 1 g/l;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 0,5 g/l;  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  a 24 mg/l;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 3 mg/l;  $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 3 mg/l;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 0,04 mg/l;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 10 mg/l; pantotenato a 3,2 mg/l; hidrocloreuro de tiamina a 9,5 mg/l; vitamina B12 a 0,15 mg/l.

El cultivo se ilumina con 60 destellos por hora, en donde cada destello tiene una duración de 20 segundos y una intensidad de 500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Seguimiento de los cultivos:

50 El seguimiento de la concentración en forma de biomasa total se realiza por la medición de la masa seca (filtración sobre filtro GF/F, Whatman, y a continuación secado en estufa a 105 °C durante un mínimo de 24 h antes de pesarla).

En cuanto a la cuantificación de los lípidos totales, se han extraído aproximadamente  $10^8$  células. Los métodos de extracción de los lípidos los conoce el experto en la técnica.

Para la cuantificación de los carotenoides, y en concreto de la cantaxantina, se han extraído  $10^8$  células. Los métodos de extracción y de análisis de los carotenoides, entre ellos la cantaxantina, los conoce el experto en la técnica.

5 Tabla 4: Resultados (n = 3)

Masa seca (g/l)	Lípidos totales (% de la MS)	% de DHA	Cantaxantina (mg/g de MS)
155 ± 3,3	55 ± 2,8	18,0 ± 3,0	2,1 ± 0,3

10 En la tabla 4 se representan los datos comparativos para la producción de aceite rico en DHA a partir de *Aurantiochytrium* según el procedimiento de la invención (desacoplado) y discontinuo, semicontinuo y continuo. Los valores citados por los procedimientos discontinuo, semicontinuo y continuo son, a título predictivo a lo largo de un año, basados en nuestros experimentos anteriores con esta cepa y con las otras cepas, similares en cultivo discontinuo, semicontinuo y continuo.

Tabla 5

OPERACIÓN UNITARIA	DISCONTINUO	SEMIDISCONTINUO	CONTINUO	DESACOPLADO
<b>Biomasa producida</b> (% relativo con respecto a la biomasa producida en el modo desacoplado)	5,8%	29%	84,3%	100%
Vertidos durante la concentración	1280 m <sup>3</sup> /año	-	9 690 m <sup>3</sup> /año	
	3,9 m <sup>3</sup> /día		29,4 m <sup>3</sup> /día	
Vertidos durante el secado (agua)	280 t/año	1 400 t/año	3 990 t/año	4 810 t/año
	0,85 t/día	4,2 t/día	13,3 t/día	14,6 t/día
<b>Razón de kg de vertidos/kg de biomasa producida</b>	<b>39 l</b>	<b>7 l</b>	<b>24 l</b>	<b>7 l</b>
<b>Sin limpieza</b>				

Ejemplo 2

15 Producción en continuo de una biomasa con gran densidad celular y poca materia grasa (del 5 al 10 %) y la posterior acumulación de ácidos grasos por la maduración de esta biomasa.

Etapa a): Cultivo continuo para la producción de la biomasa.

20 Los cultivos de *Aurantiochytrium* se realizan en reactores de 1 a 2 l de volumen útil con robots especializados que están supervisados por una estación de trabajo. El sistema tiene regulado el pH mediante la adición de una base (solución de hidróxido de sodio a 2 N) y/o de un ácido (solución de ácido sulfúrico a 1 N). La temperatura de cultivo se fija a 26 °C. La agitación se realiza gracias a 3 elementos móviles para la agitación: 1 turbina Rushton con 6 paletas rectas colocadas en el extremo inferior del árbol de agitación por encima del burbujeador y 2 hélices con 3 paletas colocadas sobre el árbol de agitación (distancia entre los elementos móviles = 1,5 × el diámetro de una hélice).

25 La presión de oxígeno disuelto está regulada en el medio a lo largo del cultivo gracias a la velocidad de rotación del árbol de agitación (250-600 rpm) y a la ventilación con aire (0,25-1 vvm) o con oxígeno (0,1-0,5 vvm). Los parámetros de regulación, integrados en el robot con supervisión, permiten mantener una pO<sub>2</sub> constante al 15 %.

El fermentador está equipado con un sistema interno de iluminación fijado sobre cada paleta opuesta.

30 La intensidad y la frecuencia de los ciclos de iluminación están controlados por un robot especializado que está supervisado por una estación de trabajo. El cultivo se ilumina con 60 destellos por hora, en donde cada destello tiene una duración de 20 segundos y una intensidad de 100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

El precultivo se realiza sobre una bandeja de agitación (140 rpm) en un recinto termostatzado (26 °C) y con una iluminación entre 100 y 200 µE. El reactor se inocula al 1 % a partir del precultivo y se prosigue en modo discontinuo.

5 Una vez que se ha consumido el sustrato contenido en el medio inicial y se ha alcanzado la densidad celular deseada, se ponen en marcha, por una parte, el trasvase del medio de cultivo y, por otra parte, el aporte de la solución de alimentación. El régimen permanente se alcanza al cabo de al menos 5 tiempos de residencia. Una vez que se ha estabilizado el régimen permanente, los parámetros de funcionamiento (caudal de ventilación, potencia disipada, caudal de alimentación, pH, volumen de caldo), permanecen constantes la concentración residual de sustrato en el caldo, así como la concentración y la composición macromolecular de la biomasa producida.

10 Para la cepa FCC 1324, la composición de la solución de alimentación elegida y el factor de dilución seleccionado permiten producir cada día un volumen de caldo que equivale a 2,4 veces el volumen del fermentador.

15 El régimen se considera estable al cabo de 50 horas de cultivo. Una vez que el régimen se ha estabilizado, la concentración residual de la glucosa en el caldo se estabiliza cerca de 0 g/l, la densidad celular se estabiliza en torno a  $3 \times 10^9$  células/ml, lo que corresponde a aproximadamente 65 g/l de biomasa, el contenido de materia grasa en la biomasa se estabiliza en torno al 5 % (gramos de materia grasa/gramos de materia seca). La fermentación en modo continuo se ha mantenido durante un total de 890 horas, de las cuales 815 horas eran en régimen estabilizado.

Para este ejemplo, el factor de dilución para la solución de alimentación está fijado en la mitad de la tasa de crecimiento máxima de la cepa sobre el medio utilizado y en las condiciones de cultivo utilizadas.

El caudal de trasvase del medio se adapta para tener en cuenta el caudal de la solución de alimentación, pero también el volumen de líquido con el que se corrige el pH.

20 La composición del medio de cultivo para el arranque del cultivo en discontinuo se detalla en la tabla 1.

La solución de alimentación del cultivo continuo contiene 15 g/l de sal de marina comercial (ex Sales INSTANT OCEAN), 110 g/l de glucosa y contiene concentraciones de oligoelementos, macroelementos y vitaminas equivalentes a aproximadamente 3 veces las contenidas en el medio utilizado para el precultivo y para el cultivo discontinuo. Se pueden usar otras composiciones para la solución de alimentación, tal y como se detalla en la tabla 1.

25 La concentración de biomasa total va seguida de la medición de la masa seca (filtración sobre filtro GF/F, Whatman, y luego secado en estufa a 105 °C durante un mínimo de 24 h antes de pesarla).

En cuanto a la cuantificación de los lípidos totales, se han extraído aproximadamente  $10^8$  células. Los métodos de extracción de los lípidos los conoce el experto en la técnica.

30 Para la cuantificación de los carotenoides y en concreto de la cantaxantina, se han extraído  $10^8$  células. Los métodos de extracción y de análisis de los carotenoides, entre ellos la cantaxantina, los conoce el experto en la técnica.

Tabla 6. Características del régimen permanente obtenido en el cultivo continuo

Glucosa residual	0,1 ± 0,02	g/l
Densidad celular	$3,109 \pm 0,5 \times 10^9$	células/ml
Masa seca	65 ± 5	g/l
Contenido de ácidos grasos	7 % ± 3 %	%

#### Etapa b) de maduración

35 El caldo producido en el cultivo continuo presenta, así pues, una elevada densidad de células de una biomasa que contiene muy pocos lípidos (del 5 al 10 %). Esta biomasa se transfiere a interior de un tanque de maduración en las condiciones de cultivo en las que los ácidos grasos se acumulan muy rápidamente (65 g/l en 24 horas). Esto permite producir una gran concentración de biomasa rica en ácidos grasos.

40 En este ejemplo, se realizan varios ensayos de maduración a partir del caldo procedente del fermentador que ha funcionado en modo quimiostato. Los cultivos se realizan en fermentadores (biorreactores) de 3 a 5 l útiles con robots especializados que están supervisados por una estación de trabajo. Los sistemas de regulación, al igual que los parámetros de estos últimos, son, punto por punto, similares a los de la etapa a).

En el caso de los ensayos de maduración descritos en este ejemplo, el volumen extraído del cultivo continuo se extrae de una sola vez. En el caso de una fermentación industrial, esta transferencia se hace de un modo progresivo, mediante el trasvase de medio de cultivo.

## ES 2 704 903 T3

En el tanque de maduración, al volumen extraído se le añade progresivamente la solución nutritiva con una razón C/N/P de 530:11:1.

La solución nutritiva se añade en el tanque de maduración cada vez que se agota la fuente de carbono (aquí la glucosa).

5 El seguimiento del cultivo discontinuo con alimentación, realizado en un tanque de maduración, se realiza según los protocolos idénticos, en todos los aspectos, a los de la etapa i). Los resultados se ofrecen en la tabla 7.

Tabla 7:

Materia seca, ácidos grasos y DHA producidos en 24 horas y en 48 horas durante la maduración a 25 °C y a pH 6,5 (5 repeticiones)

	<b>24 horas de cultivo</b>	<b>48 horas de cultivo</b>
Materia seca	160 g/l (± 2 g/l)	185 g/l (± 5 g/l)
Ácidos grasos	67 g/l (± 2 g/l)	85 g/l (± 5 g/l)
DHA	16,5 g/l (± 0,5 g/l)	21 g/l (± 2 g/l)
Astaxantina	0,05 mg/g MS (± 0,01)	0,07 mg/g MS (± 0,01)

10 Ejemplo 3

A continuación se describe la producción de biomasa utilizable en piscicultura o para la producción de luteína por la cepa FCC 1520 del género *Chlorella*.

Etapas a):

15 Los cultivos de *Chlorella* se realizan en los fermentadores (biorreactores) de 1 a 2 l útiles con robots especializados que están supervisados por una estación de trabajo. El sistema tiene regulado el pH mediante la adición de una base (solución de hidróxido de sodio a 2 N) y/o de un ácido (solución de ácido sulfúrico a 1 N). La temperatura de cultivo se fija a 26 °C. La agitación se realiza gracias a 3 elementos móviles para agitación colocados sobre el árbol según la configuración de Rushton (hélices de 3 paletas con bombeo descendente). La presión del oxígeno disuelto se regula en el medio a lo largo del cultivo, por la velocidad de agitación (250-600 rpm), el caudal de aire (0,25-1 vvm), o bien el caudal de oxígeno (0,1-0,5 vvm). Los parámetros de regulación, integrados en el robot con supervisión, permiten mantener una pO<sub>2</sub> constante al 15 %. El biorreactor está equipado con un sistema de iluminación interna fijado sobre cada paleta opuesta. La intensidad, así como los ciclos de luz, están controlados por el robot especializado que está supervisado por la estación de trabajo. El cultivo se ilumina con 30 destellos por hora, en donde cada destello tiene una duración de 60 segundos y una intensidad de 50 a 100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

25 Los reactores se inoculan con un precultivo realizado sobre una bandeja de agitación (140 rpm) en un recinto termostatzado (26 °C) y con iluminación entre 100 y 200 μE. Los precultivos y cultivos de los biorreactores se realizan en el medio siguiente: glucosa a 20 g/l; KNO<sub>3</sub> a 2 g/l; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 0,54 g/l; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O a 0,179 g/l; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O a 0,2465 g/l; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O a 0,0147 g/l; extracto de levadura a 0,25 g/l; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O a 0,01035 g/l; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> a 0,000061 g/l; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O a 0,000169 g/l; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O a 0,000287 g/l; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O a 0,0000025 g/l; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>MoO<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O a 0,0000125 g/l; hidrocloreuro de tiamina (vitamina B1) a 0,2 mg/l; biotina (vitamina H) a 0,001 mg/l; cianocobalamina (vitamina B12) a 0,001 mg/l.

35 La alimentación en continuo con el medio recién preparado se realiza con un factor de dilución de aproximadamente 0,08 a 0,15 h<sup>-1</sup> y con el medio siguiente: glucosa a 224,55 g/l; KNO<sub>3</sub> a 22,45 g/l; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O a 0,165 g/l; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O a 2,77 g/l; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O a 0,17 g/l; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> a 0,0015 g/l; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O a 0,0042 g/l; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O a 0,0072 g/l; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O a 0,0000625 g/l; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>MoO<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O a 0,0003125 g/l; hidrocloreuro de tiamina (vitamina B1) a 2,24 mg/l; biotina (vitamina H) a 0,0112 mg/l; cianocobalamina (vitamina B12) a 0,0112 mg/l. El experto en la técnica sabrá determinar cómo poner en práctica el cultivo continuo y cómo calcular el caudal de alimentación, así como determinar cuándo se alcanza el régimen permanente.

40 Una vez se alcanza el régimen permanente, el trasvase desde este fermentador continuo puede servir para alimentar el fermentador de maduración de la etapa b).

Etapas b):

Los cultivos se realizan en fermentadores (biorreactores) de 10 a 20 l útiles con robots especializados que están supervisados por una estación de trabajo. Los sistemas de regulación, así como los parámetros de este últimos, son, en todos los aspectos, similares a los de la etapa a).

## ES 2 704 903 T3

5 Los reactores se inoculan con aproximadamente el 50% del volumen total del cultivo con el trasvase de la etapa a); y al mismo tiempo, el tanque se alimenta también con el mismo caudal con un medio concentrado 2 veces y que permite obtener la composición final siguiente: glucosa a 500 g/l; KNO<sub>3</sub> a 50 g/l; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 13,5 g/l; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•12H<sub>2</sub>O a 4,47 g/l; MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O a 6,1625 g/l; CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O a 0,3675 g/l; FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O a 0,086 g/l; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> a 0,061 g/l; MnSO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O a 0,169 g/l; ZnSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O a 0,287 g/l; CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O a 0,0025 g/l; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>MoO<sub>24</sub>•4H<sub>2</sub>O a 0,0125 g/l; hidrocioruro de tiamina (vitamina B1) a 5 mg/l; biotina (vitamina H) a 0,025 mg/l; cianocobalamina (vitamina B12) a 0,025 mg/l.

El cultivo se ilumina con 30 destellos por hora, en donde cada destello tiene una duración de 20 segundos y una intensidad de 100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Seguimiento de los cultivos:

10 El seguimiento de la concentración en forma de biomasa total se realiza con la medición de la masa seca (filtración sobre filtro GF/F, Whatman, y luego el secado en estufa a 105 °C durante un mínimo de 24 h antes de pesarla).

Para la cuantificación de los carotenoides y en concreto de la luteína, se extraen 10<sup>8</sup> células. Los métodos de extracción y de análisis de los carotenoides, entre ellos la luteína, los conoce el experto en la técnica.

Tabla 8: Resultados (n = 3)

Masa seca (g/l)	Cantaxantina (mg/g de MS)
130 ± 5	5,1 ± 0,1

15

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de producción de biomasa de células de organismos unicelulares eucariotas capaces de crecer mediante el uso de la luz y una fuente de carbono orgánico, caracterizado por que consiste en:
- a) el cultivo de las células en modo continuo en condiciones de mixotrofia o heterotrofia en un fermentador, y luego
- 5 b) la alimentación en continuo y sucesivamente de  $n$  fermentadores que funcionan en modo semicontinuo, en donde  $n$  es un número entero igual o superior a 2, con las células producidas en la etapa a) y su cultivo en condiciones de mixotrofia
- y en el que el cultivo de las células en las condiciones de mixotrofia se realiza en condiciones de iluminación discontinua y/o variable a lo largo del tiempo, y en el que la iluminación presenta variaciones de intensidad cuya
- 10 amplitud está comprendida entre 50 y 1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , en donde estas variaciones tienen lugar entre 2 y 3600 veces por hora.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la iluminación presenta variaciones de intensidad cuya amplitud está comprendida entre 50 y 400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , en donde estas variaciones tienen lugar entre 2 y 200 veces por hora.
- 15 3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que la iluminación es en forma de destellos.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el cultivo en la etapa a) se hace en presencia de destellos, que tienen una intensidad de 50 a 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y una duración de aproximadamente 1/10 de segundo a cinco minutos, preferiblemente entre un segundo y un minuto, y entre 2 y 3600,
- 20 preferiblemente, entre 2 y 360, destellos por hora.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el cultivo en la etapa b) se realiza en presencia de destellos, que tienen una intensidad de 50 a 2000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y una duración de aproximadamente 1/10 de segundo a cinco minutos, preferiblemente entre un segundo y un minuto, y entre 2 y 3600,
- preferiblemente entre 2 y 360, destellos por hora.
- 25 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que el cultivo en las etapas a) y/o b) se realiza en presencia de un sustrato de carbono orgánico con una concentración de 5 mM a 1,1 M, preferiblemente de 50 mM a 800 mM.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que los organismos unicelulares eucariotas se eligen entre los protistas marinos o de agua dulce fotosintéticos.
- 30 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que los organismos unicelulares eucariotas son protistas mixótrofos elegidos entre las especies de los géneros siguientes: *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, *Odontella*, *Phaeodactylum*, *Nannochloris*, *Cryptocodinium*, *Monodus*, *Nannochloropsis*, *Isochrysis*, *Euglena*, *Cyclotella*, *Nitzschia*, *Aurantiochytrium*, *Scenedesmus* y/o *Tetraselmis*.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que los organismos unicelulares eucariotas son protistas mixótrofos elegidos entre las especies *Chlorella* y *Haematococcus*.
- 35 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que comprende además al menos una etapa de recuperación de la biomasa procedente de la etapa b).
11. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado por que dicha biomasa comprende al menos una molécula de interés elegida entre un alcohol, un ácido orgánico, un ácido graso, un polisacárido, un terpeno, tal como un botriococeno, un pigmento tal como un carotenoide, un aminoácido, una enzima, una vitamina, un antibiótico, un compuesto con actividad farmacológica tal como una proteína exógena o recombinante, y un pigmento.
- 40 12. Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado por que dicha molécula de interés se elige entre el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA), el ácido araquidónico (ARA), el ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA), el ácido oleico, la fucoxantina, la cantaxantina, la astaxantina, la luteína y el  $\beta$ -caroteno.
- 45 13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado por que comprende además al menos una etapa de recuperación de los lípidos y/o pigmentos, posiblemente, al menos una etapa de extracción de EPA y/o de DHA y/o de ARA y/o de pigmentos a partir de dichos lípidos.
14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado por que la etapa b) se realiza entre 15 y 24 °C.

