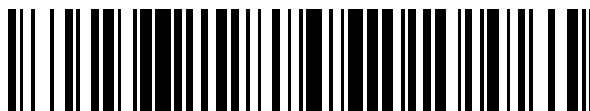


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 839**

51 Int. Cl.:

C12N 1/12 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2014** **E 16168232 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018** **EP 3067414**

54 Título: **Procedimiento de enriquecimiento en proteínas de la biomasa de microalgas**

30 Prioridad:

29.03.2013 FR 1352857

19.08.2013 FR 1358052

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

11.04.2019

73 Titular/es:

CORBION BIOTECH, INC. (100.0%)

One Tower Place, Suite 600

South San Francisco, CA 94080, US

72 Inventor/es:

MACQUART, GABRIEL;

DELAROCHE, SYLVAIN;

LE RUYET, MARIE y

SEGUEILHA, LAURENT

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 708 839 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 enriquecimiento en proteínas de la biomasa de microalgas

La presente invención está relacionada con un procedimiento de enriquecimiento en proteínas de la biomasa de microalgas, más particularmente del género *Chlorella*, más particularmente aún de la especie *Chlorella sorokiniana* o *Chlorella protothecoides*.

Las algas, macro y micro, tienen una riqueza específica en gran parte inexplorada. Su explotación con fines alimenticios, químicos o bioenergéticos es todavía muy marginal. Contienen, sin embargo, componentes de gran valor, cuya riqueza y abundancia sólo la fauna marina, que se alimenta de ellas, es verdaderamente capaz de apreciar.

Las microalgas son, en efecto, fuentes de vitaminas, lípidos, proteínas, azúcares, pigmentos y antioxidantes.

Las algas y microalgas interesan así al sector industrial, que las utiliza para la fabricación de complementos alimenticios, de alimentos funcionales, de cosméticos, de medicamentos o para la acuicultura.

Las microalgas son, ante todo, microorganismos fotosintéticos que colonizan todos los biotopos expuestos a la luz.

A escala industrial, su cultivo monoclonal se realiza en fotobiorreactores (condiciones autotróficas: a la luz con CO₂) o para algunas de entre ellas, también en fermentadores (condiciones heterotróficas: en la oscuridad en presencia de una fuente carbonada).

Algunas especies de microalgas son en efecto capaces de crecer en ausencia de luz: *Chlorella*, *Nitzschia*, *Cyclotella*, *Tetraselmis*, *Cryptocodinium*, *Schizochytrium*.

De hecho, se estima que el cultivo en condiciones heterotróficas cuesta 10 veces más barato que en condiciones fototróficas ya que, para el experto en la materia, estas condiciones heterotróficas permiten:

- la utilización de fermentadores idénticos a los utilizados para las bacterias y las levaduras y permiten el control de todos los parámetros de cultivo,

- la producción de biomasa en cantidad mucho más elevada que la que se obtiene mediante cultivo basado en la luz.

La explotación rentable de las microalgas necesita generalmente el control de las condiciones de fermentación que permiten acumular sus componentes de interés, tales como:

- los pigmentos (clorofila a, b y c, β -caroteno, astaxantina, luteína, ficocianina, xantófilos, ficoeritrina, etc.) cuya demanda es creciente, tanto por sus notables propiedades antioxidantes, como por su aporte de colores naturales en la alimentación,

- las proteínas, con el fin de optimizar sus cualidades nutritivas; o

- los lípidos, con el fin de optimizar su contenido en ácidos grasos (hasta el 60%, incluso el 80% en peso de su materia seca) en particular para:

- las aplicaciones biocarburantes, pero también
- las aplicaciones en alimentación humana o animal, cuando las microalgas seleccionadas producen ácidos grasos poliinsaturados o PUFAs denominados "esenciales" (es decir, aportados por la alimentación ya que no son producidos de manera natural por el hombre o el animal).

Para alcanzar este resultado, se han trabajado así ampliamente primeros procedimientos de fermentación que permiten obtener altas densidades celulares (acrónimo inglés: HCD por *High-Cell-Density*), con el fin de obtener rendimientos y productividades máximos en proteínas o en lípidos.

El objetivo de estos cultivos HCD era la obtención de la concentración más elevada posible del producto deseado en el lapso de tiempo más corto.

Este precepto se verifica por ejemplo para la biosíntesis de astaxantina por *Chlorella zofingiensis*, en la que el crecimiento de la microalga se mostró correlacionado directamente con la producción de este compuesto (Wang y Peng, 2008, *World J Microbiol, Biotechnol.*, 24(9), 1915-1922).

Sin embargo, el hecho de mantener el crecimiento en su tasa máxima (μ , en h⁻¹) no está siempre correlacionado con la producción elevada del producto deseado.

En efecto, se reveló rápidamente a los especialistas del campo que es necesario, por ejemplo, someter a las microalgas a un estrés nutricional que limita su crecimiento cuando se desea hacerlas producir importantes reservas lipídicas.

Por lo tanto, se procede a partir de ahora al desacoplamiento crecimiento/producción en los procedimientos de fermentación.

Por ejemplo, para favorecer la acumulación de ácidos grasos poliinsaturados (aquí el ácido docosahexaenoico o DHA), la solicitud de patente WO 01/54510 recomienda disociar el crecimiento celular y la producción de ácidos grasos poliinsaturados.

En la microalga *Schizochytrium sp* cepa ATCC 20888, se procede así a una primera fase de crecimiento sin limitación en oxígeno, a fin de favorecer la obtención de una alta densidad celular (más de 100 g/l) después, en una segunda fase, de ralentizar progresivamente el aporte de oxígeno, a fin de estresar a la microalga, ralentizar su crecimiento e iniciar la producción de los ácidos grasos de interés.

En la microalga *Cryptocodinium cohnii*, el contenido más elevado en ácido docosahexaenoico (DHA, ácido graso poliinsaturado) se obtiene a baja concentración en glucosa (del orden de 5 g/l), y así a baja tasa de crecimiento (Jiang y Chen, 2000, *Process Biochem.*, 35(10), 1205-1209).

Estos resultados ilustran bien el hecho de que las cinéticas de formación de los productos pueden también estar asociadas tanto de manera positiva como de manera negativa con el crecimiento de las microalgas, incluso con una combinación de las dos.

Por este motivo, en los casos en los que la formación de los productos no está correlacionada con un crecimiento celular elevado, es juicioso controlar la tasa de crecimiento celular.

En general, el experto en la materia elige controlar el crecimiento de las microalgas mediante el control de las condiciones de fermentación (Tp, pH...), o mediante la alimentación regulada en componentes nutricionales del medio de fermentación (condiciones semicontinuas denominadas "fed-batch").

Si elige controlar el crecimiento de las microalgas en heterotrofia mediante el aporte de fuentes carbonadas, el experto en la materia elige generalmente adaptar la fuente carbonada (glucosa pura, acetato, etanol...) a la microalga (*C. cohnii*, *Euglena gracilis*...) en función del metabolito producido (por ejemplo, un ácido graso poliinsaturado de tipo DHA).

La temperatura puede ser también un parámetro clave:

- por ejemplo, se ha informado de que la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados en algunas especies de microalgas, tal como la EPA por *Chlorella minutissima*, se ve favorecida a una temperatura más baja que la requerida para el crecimiento óptimo de dicha microalga;

- por el contrario, el rendimiento en luteína es más elevado en *Chlorella protothecoides* cultivada en heterotrofia, cuando se aumenta la temperatura de producción de 24 a 35°C.

Chlorella protothecoides está reconocida justamente como una de las mejores microalgas productoras de aceite.

En condiciones heterotróficas, ella transforma rápidamente los hidratos de carbono en triglicéridos (más del 50% de su materia seca).

Para optimizar esta producción de triglicéridos, el experto en la materia se ve obligado a optimizar el flujo carbonado hacia la producción de aceite, actuando sobre el entorno nutricional del medio de fermentación.

Así, se conoce que la acumulación de aceite se produce durante un aporte carbonado suficiente, pero en condiciones de deficiencia de nitrógeno.

Por lo tanto, la relación C/N es aquí determinante, y se admite que los mejores resultados se obtienen actuando directamente sobre el contenido en nitrógeno, no siendo limitante el contenido en glucosa.

De manera no sorprendente, esta deficiencia de nitrógeno afecta al crecimiento celular, lo que produce como resultado una tasa de crecimiento del 30% más baja que la tasa de crecimiento normal de la microalga (Xiong *et al.*, *Plant Physiology*, 2010, 154, pp1001-1011).

Para explicar este resultado, Xiong *et al.*, en el artículo citado anteriormente, demuestran en efecto que si se divide la biomasa de *Chlorella* en sus 5 componentes principales, es decir hidratos de carbono, lípidos, proteínas, ADN y ARN (representando el 85% de su materia seca), si la relación C/N no tiene ningún impacto sobre el contenido en ADN, en ARN y en hidratos de carbono, se vuelve preeminente para el contenido en proteínas y en lípidos.

Es así que las células de *Chlorella* cultivadas con una relación C/N baja contienen un 25,8% de proteínas y un 25,23% en lípidos, mientras que una relación C/N elevada permite la síntesis de 53,8% de lípidos y 10,5% de proteínas.

Para optimizar su producción en aceite, es por lo tanto primordial para el experto en la materia controlar el flujo carbonado desviándolo hacia la producción de aceite, en detrimento de la producción de proteínas; el flujo carbonado

se redistribuye y se acumula en sustancias de reserva lipídicas cuando las microalgas se colocan en un medio con deficiencia de nitrógeno.

Apoyándose en esta enseñanza, para la producción de biomasa rica en proteínas, el experto en la materia es inducido, por lo tanto, a realizar lo contrario de este control metabólico, es decir, trabajar las condiciones de fermentación favoreciendo, en su lugar, una relación C/N baja, y así:

- realizar un aporte importante de fuente de nitrógeno al medio de fermentación, manteniendo al mismo tiempo constante la carga en fuente carbonada que se convertirá en proteínas, y
- estimular el crecimiento de la microalga.

Se trata de modificar el flujo carbonado hacia la producción de proteínas (y por lo tanto de biomasa), en detrimento de la producción de lípidos de reserva.

SANSAWA *et al.* (2004, Journal of Bioscience and Bioengineering, 98, 437-444) y DOUCHA *et al.* (2012, Journal of Applied Phycology, 24, 35-43) describen un procedimiento de cultivo en heterotrofia de una microalga de tipo *Chlorella* que comprende una etapa de deficiencia total de alimentación en glucosa del medio de fermentación.

YongCheng *et al.* (2008, Limnology and Oceanography, 53, 1790-1804) y Avakyan *et al.* (1993, Prikladnaa Biohimia I Mikrobiologia – Applied Biochemistry and Microbiology, 29, 723-727) describen condiciones limitantes en fosfato sobre algas en fototrofia.

Dentro del ámbito de la invención, la empresa solicitante ha elegido explorar una vía original proponiendo una solución alternativa a la clásicamente contemplada por el experto en la materia.

La invención se refiere así a un procedimiento de enriquecimiento en proteínas de una microalga cultivada en heterotrofia, microalga del género *Chlorella*, más particularmente aún *Chlorella sorokiniana* o *Chlorella protothecoides*, procedimiento de cultivo heterotrófico que comprende una etapa que tiene como objetivo limitar el crecimiento de dicha microalga mediante una deficiencia en fosfato del medio de fermentación.

Esta etapa es una etapa de cultivo heterotrófico en la que el fosfato se aporta en cantidad insuficiente en el medio para permitir el crecimiento de la microalga. Cabe señalar que por cantidad insuficiente no se entiende un aporte nulo en este factor nutritivo. Esta fase de deficiencia nutritiva conduce entonces a ralentizar (limitar) el metabolismo celular, sin inhibirlo totalmente.

En el sentido de la invención, “el enriquecimiento” se entiende un aumento del contenido en proteínas de la biomasa de al menos el 15%, preferentemente de al menos el 20% en peso, a fin de alcanzar un contenido en proteínas de la biomasa de más del 50% en peso.

La invención se refiere más precisamente un procedimiento de cultivo heterotrófico de dichas microalgas que comprende una etapa que tiene como objetivo limitar el crecimiento de dicha microalga mediante una deficiencia del medio de fermentación en fosfato.

Así, la presente invención se refiere a un procedimiento de enriquecimiento en proteínas de una microalga cultivada en heterotrofia, microalga del género *Chlorella*, más particularmente aún *Chlorella sorokiniana* o *Chlorella protothecoides*, comprendiendo el procedimiento el cultivo heterotrófico que comprende una etapa que tiene como objetivo limitar el crecimiento de dicha microalga mediante una deficiencia del medio de fermentación en fosfato, permitiendo así alcanzar un contenido en proteínas de la biomasa de más de 50% en peso, estando el fosfato en deficiencia de manera que se obtenga una velocidad de crecimiento disminuida de 10 a 60 % con respecto a la velocidad de crecimiento sin limitación de fosfato.

Por “deficiencia del medio de fermentación en fosfato” se entiende un cultivo en el cual el fosfato se aporta a la microalga en cantidad insuficiente para permitir su crecimiento.

La duración de la fase de cultivo deficiente en fosfato es al menos 1 h, preferentemente de al menos 10 h, más preferiblemente de al menos 20 h, en particular entre 30 y 60 h.

Esto se traduce en una ausencia de fosfato residual en el medio de cultivo, consumiendo la microalga este factor nutritivo a medida que se aporta. Sin embargo, la ausencia de fosfato residual en el medio de cultivo se debe distinguir de una situación en la cual la microalga está totalmente privada de fosfato.

En el sentido de la invención, el criterio esencial es, por lo tanto, la limitación del crecimiento celular inducido por un estrés, estrés celular provocado por la deficiencia en fosfato del medio de fermentación.

Por lo tanto, esta estrategia va en contra del prejuicio técnico según el cual, para aumentar el contenido en proteínas de la biomasa, se necesita inevitablemente incrementar esta biomasa y, por lo tanto, el crecimiento celular.

Como se ejemplificará a continuación, se puede elegir ventajosamente limitar el crecimiento de *Chlorella*

protothecoides mediante una deficiencia en fosfatos del medio de fermentación.

En particular, para estas cepas, el fosfato se aporta a fin de obtener una velocidad de crecimiento comprendida entre 0,06 h⁻¹ y 0,09 h⁻¹.

5 En un modo muy particular, la cepa de *Chlorella sorokiniana* es la cepa UTEX 1663 - *The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin* - USA. En un modo muy particular, la cepa de *Chlorella protothecoides* es la cepa CCAP211/8D - *The Culture Collection of Algae and Protozoa, Scotland, UK*.

De manera opcional, la limitación del crecimiento de dicha microalga se puede obtener mediante la adición en el medio de cultivo de sustancias inhibitoras del crecimiento celular, como los sulfatos.

10 Por otro lado, sin estar atada a ninguna teoría, la empresa solicitante ha encontrado que el flujo de glucosa se utiliza normalmente en las microalgas del género *Chlorella sorokiniana* según un orden de prioridad bien preciso:

1. el metabolismo basal,
2. el crecimiento, es decir, formación de una biomasa rica en proteínas,
3. las sustancias de reserva (lípidos e hidratos de carbono como el almidón).

15 Este principio permite explicar las variaciones naturales de contenido en proteínas durante el crecimiento de la microalga, a pesar del aporte constante de nitrógeno.

La empresa solicitante ha encontrado así que, para enriquecer la biomasa de microalgas en proteínas, es necesario limitar el crecimiento de la microalga y controlar su consumo de fuente nutritiva diferente del nitrógeno, a fin de:

- dedicar el consumo total de glucosa a las vías de producción de proteínas,
- evitar la acumulación de sustancia de reserva como los lípidos.

20 En efecto, evitar una deficiencia de nitrógeno permite impedir la desviación de los flujos metabólicos hacia la producción de lípidos.

De manera opcional, puede ser ventajoso llegar a bloquear completamente cualquier síntesis de material de reserva, actuando por medio de inhibidores específicos.

25 En efecto, se conoce un cierto número de inhibidores de las vías de síntesis de los lípidos, incluso del almidón (hidrato de carbono de reserva por excelencia de las microalgas verdes):

- para los lípidos, la cerulenina se describe como inhibidor de la síntesis de los ácidos grasos, o la lipstatina, sustancia natural producida por *Streptomyces toxytricini*, como inhibidor de las lipasas...
- para el almidón, los iminoazúcares (obtenido por simple sustitución del átomo de oxígeno endocíclico de los azúcares por un átomo de nitrógeno) son históricamente conocidos como inhibidores potentes de las glicosidasas, de las glicosiltransferasas, de los glicógenos fosforilasas, o de la UDP-Galp mutasa.

30 Así, el procedimiento comprende la fermentación de una biomasa de microalgas en condiciones heterotróficas con una primera etapa de crecimiento de la biomasa y con una segunda etapa de deficiencia del medio de fermentación en fosfato.

35 Esta segunda etapa permite enriquecer la biomasa en proteína. En particular, permite alcanzar un contenido en proteínas de la biomasa de más del 50% en peso (en peso de materia seca).

40 El procedimiento de cultivo heterotrófico de dichas microalgas, en particular *Chlorella protothecoides*, comprende una etapa de crecimiento de las microalgas en la cual una limitación del aporte de fosfatos limita la velocidad de crecimiento y provoca un incremento del contenido en proteínas. Así, el cultivo heterotrófico de las microalgas de la especie *Chlorella protothecoides* comprende una etapa de cultivo heterotrófico con una deficiencia en fosfatos, reduciéndose así la velocidad de crecimiento y provocando un incremento del contenido en proteínas.

La invención se comprenderá mejor con la ayuda de los ejemplos que siguen, los cuales pretenden ser ilustrativos y no limitativos.

EJEMPLOS

45 **Ejemplo 1 (comparativo): producción de *Chlorella sorokiniana* en fermentación de tipo «lote secuencial» sin limitación del aporte de medio nutritivo**

La cepa utilizada es una *Chlorella sorokiniana* (cepa UTEX 1663 - *The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin* - USA).

Precultivo:

- 600 ml de medio dentro de un Erlenmeyer de 2 l;
- Composición del medio (tabla 1 siguiente)

Tabla 1.

5

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

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

La incubación se desarrolla en las condiciones siguientes:

- duración: 72h;
- temperatura: 28°C;
- agitación: 110 rpm (Incubador Infors Multitron).

El precultivo se transfiere a continuación al interior de un fermentador de 30l de tipo Sartorius.

Cultivo para producción de biomasa:

El medio es idéntico al del precultivo, pero la urea se sustituye por NH₄Cl.

10

15

Tabla 2

Macro	Glucosa	20
	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,7
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,34
	Ácido cítrico	1,0
	NH ₄ Cl	1,88
	Na ₂ SO ₄	0,2
	clerol FBA3107 (antiespumante)	0,5
Micro	Na ₂ EDTA	10
	CaCl ₂	80
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	40
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,41
	CoSO ₄ ·7H ₂ O	0,24
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,24
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,5
	H ₃ BO ₃	0,11
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₇ ·4H ₂ O	0,04

El volumen inicial (Vi) del fermentador se ajusta a 13,5l después de la inoculación.

Se lleva a 16 – 20 l al final.

- 5 Los parámetros de realización de la fermentación son los siguientes:

Tabla 3

Temperatura	28°C
pH	5,0 - 5,2 por NH ₃ 28% p/p
pO ₂	> 20% (mantenido por agitación)
Agitación	300 RPM mini.
Caudal de aire	15 l/min.

- 10 Cuando la glucosa aportada inicialmente se consume, se realiza un aporte de medio idéntico al medio inicial, sin el antiespumante, en forma de una disolución concentrada que contiene 500 g/l de glucosa y los otros elementos en las mismas proporciones con respecto a la glucosa que en el medio inicial, a fin de obtener un contenido en glucosa de 20 g/l dentro del fermentador.

Se realizan otras dos adiciones idénticas de la misma manera cada vez que la concentración residual en glucosa se vuelve nula.

Se añade antiespumante Clerol FBA 3107 a demanda para evitar un espumado excesivo.

- 15 Resultados:

Después de 46h de cultivo, se obtienen 38 g/l de biomasa con un contenido en proteínas (evaluado por el N 6,25) del 36,2%.

Ejemplo 2: Producción de *Chlorella protothecoides* en fermentación de tipo discontinuo (tipo batch) con o sin limitación del aporte de fosfato

La cepa utilizada es una *Chlorella protothecoides* (cepa CCAP 211/8D – *The Culture Collection of Algae and Protozoa, Scotland, UK*).

5 Precultivo:

- 150 ml de medio dentro de Erlenmeyer de 500 ml;
- Composición del medio: 40 g/l de glucosa + 10 g/l de extracto de levadura.

La incubación se desarrolla en las condiciones siguientes: duración: 72 h; temperatura: 28°C; agitación: 110 rpm (Incubador Infors Multitron).

10 El precultivo se transfiere a continuación al interior de un fermentador de 2 l de tipo Sartorius Biostat B.

Cultivo para producción de biomasa:

La composición del medio de cultivo es la siguiente (en g/l):

Tabla 7.

Glucosa	80
Ácido cítrico	4
NH ₄ Cl	2
KH ₂ PO ₄	2 (ensayo 1) ó 3 (ensayo 2)
Na ₂ HPO ₄	2 (ensayo 1) ó 3 (ensayo 2)
MgSO ₄ , 7H ₂ O	1,5
NaCl	0,5
Extracto de levadura	5

15 El aporte de fosfato está calculado para ser limitante en el ensayo 1 y para estar en exceso en el ensayo 2. Se añade antiespumante Clerol FBA 3107 a demanda para evitar un espumado excesivo. El volumen inicial (Vi) del fermentador se ajusta a 1 l después de la inoculación.

Los parámetros de realización de la fermentación son los siguientes:

Tabla 8

Temperatura	28°C
pH	6,5 por NH ₃ 28% p/p
pO ₂	> 20% (mantenido por agitación)
Agitación	200 RPM mini.
Caudal de aire	1 l/min.

20 Resultados:

Tabla 9.

Ensayo	Duración (h)	Biomasa (g/l)	μ acumulado (h ⁻¹)	PO ₄ residual (mg/l)	% N 6,25
--------	--------------	------------------	---------------------------------------	------------------------------------	----------

ES 2 708 839 T3

1	45	36,5	0,07	0	56,1
2	36	38,1	0,09	800	48,1

Estos resultados muestran que una limitación del aporte de fosfato, confirmada por la ausencia de fosfato residual al final de la fermentación, limita la velocidad de crecimiento (medida mediante el μ acumulado) y, como la limitación por la glucosa en los ejemplos precedentes, provoca un incremento del contenido en proteínas para alcanzar valores netamente mayores que el 50 %.

5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de enriquecimiento en proteínas de una microalga cultivada en heterotrofia, microalga del género *Chlorella*, caracterizado por que el cultivo heterotrófico comprende una etapa que tiene como objetivo limitar el crecimiento de dicha microalga mediante una deficiencia en fosfato del medio de fermentación, permitiendo así alcanzar un contenido en proteínas de la biomasa de más del 50% en peso, caracterizado por que el fosfato está en deficiencia de manera que se obtenga una velocidad de crecimiento disminuida de 10 a 60% con respecto a la velocidad de crecimiento sin limitación de fosfato.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la microalga del género *Chlorella* se selecciona del grupo constituido por *Clorella sorokiniana* y *Chlorella protothecoides*.
- 10 3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por que la microalga del género *Chlorella* es *Chlorella protothecoides*.
4. Procedimiento según la reivindicación 2 ó 3, caracterizado por que la sustancia nutritiva se aporta a fin de obtener una velocidad de crecimiento comprendida entre 0,06 h⁻¹ y 0,09 h⁻¹.
- 15 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que la duración de la fase de cultivo en deficiencia es de al menos 1 h, preferentemente de al menos 10 h, más preferiblemente de al menos 20 h, en particular entre 30 y 60 h.