

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 381**

51 Int. Cl.:

**C12P 21/00** (2006.01)

**C12P 13/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.01.2015 PCT/FR2015/050123**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.07.2015 WO15107312**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2015 E 15704059 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 3097201**

54 Título: **Método de enriquecimiento de biomasa de microalgas con proteínas**

30 Prioridad:

**20.01.2014 FR 1450419**

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

**16.04.2019**

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 2 709 381 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Método de enriquecimiento de biomasa de microalgas con proteínas

5 La presente invención se refiere a un método de enriquecimiento de biomasa de microalgas con proteínas, más particularmente del género *Chlorella*, incluso más particularmente de la especie *Chlorella sorokiniana* o *Chlorella protothecoides*. La presente invención también se refiere a un método de enriquecimiento con proteínas de la biomasa de ciertas microalgas, más particularmente de *Chlorella protothecoides*, proteínas cuyo contenido de arginina y glutamina es notablemente elevado.

10 Las algas, macro y micro, tienen una riqueza específica en gran parte sin explorar. Su explotación para fines alimentarios, químicos o bioenergéticos es incluso muy secundaria. Sin embargo esconden compuestos de gran valor, en riqueza como en abundancia.

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

Las algas y microalgas interesan por lo tanto en el sector industrial que las usa para la fabricación de complementos alimentarios, alimentos funcionales, cosméticos, medicamentos o para acuicultura.

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

15 A escala industrial, su cultivo monoclonal se realiza en fotobiorreactores (condiciones autotróficas: en la luz con CO<sub>2</sub>) o para algunas entre ellas, también en fermentadores (condiciones heterotróficas: en la oscuridad en presencia de una fuente de carbono).

Varias especies de microalgas son en efecto capaces de desarrollarse en ausencia de luz: *Chlorella*, *Nitzschia*, *Cyclotella*, *Tetraselmis*, *Cryptothecodinium*, *Schizochytrium*.

20 Además se calcula que el cultivo en condiciones heterotróficas tiene un coste 10 veces menos elevado que en condiciones fototróficas ya que, para el Experto en la técnica, estas condiciones heterotróficas permiten:

- el uso de fermentadores idénticos a los usados 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 generalmente necesita el dominio de las condiciones de fermentación lo que permite acumular sus componentes de interés, tales como:

- pigmentos (clorofila a, b y c, β-caroteno, astaxantina, luteína, ficocianina, xantófilas, ficoeritrina...) cuya demanda es creciente, tanto por sus propiedades antioxidantes notables, como por su suministro de colores naturales en la alimentación,
- lípidos, esto con el fin de optimizar su contenido de ácidos grasos (hasta un 60 %, incluso un 80 % en peso de su materia seca) en particular para:

- aplicaciones en biocarburantes, y también
- aplicaciones en Alimentación humana o animal, cuando las microalgas seleccionadas producen ácidos grasos poliinsaturados o PUFA denominados "esenciales" (es decir, proporcionados por la alimentación ya que no son producidos de forma natural por el ser humano o el animal), o

- proteínas, esto con el fin de optimizar las cualidades nutritivas o por ejemplo para favorecer el suministro de aminoácidos de interés.

40 En el contexto del suministro de aminoácidos de interés, en efecto puede ser ventajoso disponer de fuentes de proteínas ricas en arginina y en glutamato.

La arginina es un aminoácido que presenta numerosas funciones en el reino animal.

La arginina se puede degradar y por lo tanto puede servir de fuente de energía, de carbono y nitrógeno para la célula que la asimila.

45 En diversos animales, entre ellos los mamíferos, la arginina se descompone en ornitina y en urea. Esta última es una molécula nitrogenada que se puede eliminar (mediante excreción en las orinas) con el fin de regular la cantidad de compuestos nitrogenados presentes en las células de los organismos animales.

La arginina permite la síntesis del monóxido de nitrógeno (NO) mediante la NO sintetasa, interviniendo de ese modo en la vasodilatación de las arterias, lo que reduce la rigidez de los vasos sanguíneos, aumenta el flujo sanguíneo y mejora de ese modo el funcionamiento de los vasos sanguíneos.

50 Los complementos alimentarios que contienen arginina se recomiendan para estimular la salud del corazón, la

función vascular, para prevenir « la agregación de las plaquetas » (riesgo de formación de coágulos sanguíneos) y para reducir la presión arterial.

La implicación de la arginina en la cicatrización de las heridas está relacionada con su papel en la formación de prolina, otro aminoácido importante para la síntesis de colágeno.

- 5 Por último la arginina es un compuesto que se usa con frecuencia, en particular por los deportistas, en las bebidas energéticas.

Con respecto al ácido glutámico, no es solamente uno de los componentes elementales usados para la síntesis de las proteínas, sino que también es el neurotransmisor excitante más extendido en el sistema nervioso central (encéfalo + médula espinal) y es un precursor del GABA en las neuronas GABAérgicas.

- 10 Con el código « E620 », el glutamato se usa como potenciador del sabor de los alimentos. Se añade a las preparaciones alimentarias para reforzar su gusto.

Además del glutamato, el Código Alimentario también ha reconocido como potenciadores del sabor a sus sales de sodio (E621), de potasio (E622), calcio (E623), amonio (E624) y magnesio (E625).

- 15 El glutamato (o sus sales) a menudo está presente en los platos listos para tomar (sopas, salsas, patatas fritas, platos cocinados). Normalmente también se usa en la cocina asiática.

En la actualidad se usa frecuentemente en combinación con aromas en los aperitivos (sabor a beicon, sabor a queso). Esto permite de destacar el sabor del beicon, del queso, etc. Es raro encontrar un aperitivo que no lo contenga.

También se encuentra en ciertas cápsulas de medicamentos pero no por sus funciones gustativas.

- 20 Por último, es el componente mayoritario de los aditivos de cocina (cubitos de caldo, fondos de salsas, salsas, etc.).

Para conseguir explotar las riquezas metabólicas de las microalgas, también se ha trabajado mucho en primeros métodos de fermentación que permiten obtener altas densidades celulares (acrónimo en inglés: HCD para *High-Cell-Density*), con el fin de obtener rendimientos y productividades máximas en proteínas o en lípidos.

- 25 El objeto de estos cultivos de HCD fue la obtención de la concentración lo más elevada posible del producto deseado en el transcurso de tiempo más corto.

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

- 30 Sin embargo, el hecho de mantener el crecimiento en su tasa máxima ( $\mu$ , en  $h^{-1}$ ) no siempre se correlaciona con la producción elevada del producto deseado.

En efecto para los especialistas del campo se manifestó rápidamente que por ejemplo había que someter a las microalgas a un estrés nutricional que limita su crecimiento cuando se desea hacer que produzcan importantes reservas lipídicas.

- 35 Por lo tanto de aquí en adelante se ha procedido al desacoplamiento de crecimiento / producción en los métodos de fermentación.

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

- 40 De forma más particular se reivindica un método para la producción de lípidos microbianos, que comprende las etapas que consisten en:

(a) realizar una fermentación de un medio que comprende microorganismos, una fuente de carbono y una fuente nutritiva limitante y asegurando condiciones suficientes para mantener una tasa de oxígeno disuelto de al menos aproximadamente un 4 % de la saturación en dicho medio de fermentación para aumentar la biomasa;

- 45 (b) a continuación proporcionar condiciones suficientes para mantener una tasa de oxígeno disuelto aproximadamente igual o inferior a un 1 % de la saturación en dicho medio de fermentación y proporcionar condiciones suficientes para permitir que dichos microorganismos produzcan dichos lípidos;

(c) y recoger dichos lípidos microbianos, en el que al menos aproximadamente un 15 % de dichos lípidos microbianos están constituidos por lípidos poliinsaturados;

- 50 y en el que en el transcurso de la fermentación se obtiene una densidad de biomasa de al menos aproximadamente 100 g/l.

- 5 Por lo tanto en la cepa ATCC 20888 de la microalga *Schizochytrium sp.*, se procede más particularmente a una primera fase de crecimiento en presencia de una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno pero sin limitación de oxígeno, con el fin de favorecer la obtención de una alta densidad celular y a continuación, en una segunda fase, detener la provisión de nitrógeno y ralentizar progresivamente el suministro de oxígeno (gestión de la presión de oxígeno disuelto o pO<sub>2</sub> de un 10 %, a un 4 %, la continuación un 0,5 %), con el fin de estresar a la microalga, ralentizar su crecimiento e iniciar la producción de los ácidos grasos de interés.
- En la microalga *Cryptothecodinium cohnii*, el contenido más elevado de ácido docosahexaenoico (DHA, ácido graso poliinsaturado) se obtiene a concentración de glucosa baja (del orden de 5 g/l), y por lo tanto a una tasa de crecimiento baja (Jiang y Chen, 2000, *Process Biochem.*, 35 (10), 1205-1209).
- 10 Estos resultados ilustran bien el hecho de que las cinéticas de formación de los productos también pueden estar en asociadas tanto de zona positiva como de forma negativa con el crecimiento de las microalgas, incluso también con una combinación de las dos.
- Por lo tanto, en el caso en el que la formación de los productos no se correlaciona con un crecimiento celular elevado, es sensato dominar la tasa de crecimiento celular.
- 15 En general, el experto en la técnica elige controlar el crecimiento de las microalgas mediante el dominio de las condiciones de fermentación (Tp, pH...), o mediante la alimentación regulada con compuestos nutricionales del medio de fermentación (condiciones semi continuas denominadas « fed-batch »).
- Si se elige controlar el crecimiento de las microalgas en heterotrofia mediante el suministro de fuentes de carbono, experto en la técnica elige generalmente adaptar la fuente de carbono (glucosa pura, acetato, etanol...) para la microalga (*C. cohnii*, *Euglena gracilis*...) en función del metabolito producido (por ejemplo un ácido graso poliinsaturado de tipo DHA).
- 20 La temperatura también puede ser un parámetro fundamental:
- por ejemplo se informó que la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados en ciertas especies de microalgas, tales como la EPA por *Chlorella minutissima*, se favorece a una temperatura más baja que la necesaria para el crecimiento óptimo de dicha microalga;
  - por el contrario el rendimiento de luteína es más elevado en *Chlorella protothecoides* cultivada en heterotrofia, cuando se aumenta la temperatura de producción de 24 a 35 °C.
- 25 *Chlorella protothecoides* se reconoce justamente como una de las mejores microalgas productoras de aceite.
- En condiciones heterotróficas, está transformando rápidamente los hidratos de carbono en triglicéridos (más de un 50 % de su materia seca).
- 30 Para optimizar esta producción de triglicéridos, el experto en la técnica se ve obligado a optimizar el flujo de carbono hacia la producción de aceite, al actuar sobre el entorno nutricional del medio de fermentación.
- Por lo tanto se sabe que la acumulación de aceite se produce durante un suministro de carbono suficiente, pero en condiciones de carencia de nitrógeno.
- 35 Por lo tanto la proporción C/N aquí es determinante, y si admite que los mejores resultados se obtienen al actuar directamente sobre el contenido de nitrógeno, el contenido de glucosa no siendo limitante.
- De manera no sorprendente, esta carencia de nitrógeno afecta al crecimiento celular, lo que da como resultado una tasa de crecimiento de un 30 % más baja que la tasa de crecimiento normal de la microalga (Xiong *et al.*, *Plant Physiology*, 2010, 154, pp 1001-1011).
- 40 Para explicar este resultado, Xiong *et al.*, en el artículo que se ha mencionado anteriormente, demuestran en efecto que si la biomasa de *Chlorella* se divide en sus 5 componentes principales, es decir, hidratos de carbono, lípidos, proteínas, ADN y ARN (que representan un 85 % de su materia seca), si la proporción C/N no tiene ningún impacto en el contenido de ADN, ARN e hidratos de carbono, se hace preeminente para el contenido de proteínas y de lípidos.
- 45 Es de este modo que las células de *Chlorella* cultivadas con una proporción C/N baja contienen un 25,8 % de proteínas y un 25,23 % de lípidos, mientras que una proporción C/N elevada permite la síntesis de un 53,8 % de lípidos y un 10,5 % de proteínas.
- Para optimizar su producción de aceite, es por lo tanto primordial para el experto en la técnica controlar el flujo de carbono desviándolo hacia la producción de aceite, en perjuicio de la producción de las proteínas; el flujo de carbono se redistribuye y se acumula en sustancias de reserva lipídicas cuando las microalgas se colocan en medio con carencia de nitrógeno.
- 50 Con el respaldo de esta enseñanza, para la producción de biomásas ricas en proteínas, el experto en la técnica se

ve obligado por lo tanto a enfrentarse a este control metabólico, es decir, trabajar las condiciones de fermentación en favoreciendo bastante una proporción C/N baja, y por lo tanto:

- realizar un suministro importante de fuente de nitrógeno al medio de fermentación, a la vez que se mantiene constante la carga de fuente de carbono que se convertirá en proteínas y
- 5 - estimular el crecimiento de la microalga.

Se trata de modificar el flujo de carbono hacia la producción de proteínas (y por lo tanto debió masas), en perjuicio de la producción de los lípidos de reserva.

10 SANSAWA *et al.* (2004, Journal of Bioscience and Bioengineering, 98, 437-444) describió un método de cultivo en heterotrofia de una microalga, *Chlorella regularis*, que comprende una etapa que tiene como objeto limitar el crecimiento de dicha microalga mediante una carencia total de alimentación de glucosa del medio de fermentación, permitiendo de este modo conseguir un contenido de proteínas de la biomasa de un 63 % en peso.

15 El documento WO2014154787, publicado después del depósito de la presente solicitud, describió un método de enriquecimiento con proteínas de una microalga cultivada en heterotrofia, microalga del género *Chlorella*, método de cultivo heterotrófico que comprende una etapa que tiene como objeto limitar el crecimiento de dicha microalga por una carencia del medio de fermentación de glucosa.

En el contexto de la invención, la compañía Solicitante ha elegido por el contrario explorar una vía original que propone una solución alternativa a la considerada clásicamente por el experto en la técnica.

20 Por lo tanto la invención se refiere a un método de enriquecimiento con proteínas de una microalga cultivada en heterotrofia, microalga del género *Chlorella*, más particularmente incluso *Chlorella sorokiniana* o *Chlorella protothecoides*, método de cultivo heterotrófico que comprende una etapa que tiene como objeto limitar el crecimiento de dicha microalga por una carencia del medio de fermentación de glucosa.

Esta etapa es una etapa de cultivo heterotrófico en la que la glucosa se proporciona en cantidad insuficiente en el medio para permitir el crecimiento de la microalga.

25 En el sentido de la invención, se entiende que « el enriquecimiento » hace referencia a un aumento del contenido de proteínas de la biomasa para conseguir un contenido de proteínas de la biomasa superior a un 50 %, un 60 %, un 65 % o un 70 % en peso.

30 De forma más precisa la invención se refiere a un método de cultivo heterotrófico de dichas microalgas que comprende una etapa que tiene como objeto limitar el crecimiento de dicha microalga por una carencia del medio de fermentación de glucosa. La temperatura de fermentación se modifica con el fin de ralentizar el crecimiento de la microalga. La temperatura de fermentación se puede aumentar en particular en 1, 2, 3, 4 o 5 grados con respecto a la temperatura óptima de fermentación que habitualmente es de aproximadamente 28 °C. De preferencia, la temperatura de fermentación se aumenta aproximadamente 3 °C, por ejemplo pasando de 28 °C a 31 °C.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término « aproximadamente » se prefiere a un valor +/- 20 %, 10 %, 5 % o 2 %. Por lo tanto la presente invención se refiere a un método de enriquecimiento con proteínas de una microalga cultivada en heterotrofia, microalga del género *Chlorella*, más particularmente incluso *Chlorella sorokiniana* o *Chlorella protothecoides*, método que comprende el cultivo heterotrófico que comprende una etapa que tiene como objeto limitar el crecimiento de dicha microalga por una carencia del medio de fermentación de glucosa, permitiendo de este modo conseguir un contenido de proteínas de la biomasa superior a un 50, un 60 o un 70 % en peso.

40 Por « carencia del medio de fermentación de glucosa » se hace referencia a un cultivo en el que la glucosa se proporciona a la microalga en cantidad insuficiente para permitir su crecimiento. Esta carencia se traduce por una tasa de crecimiento de la microalga inferior a la dicha microalga en ausencia de limitación nutricional.

Esto se traduce por una ausencia de glucosa residual en el medio de cultivo, la microalga consumiendo este factor nutritivo según su suministro.

45 En el sentido de la invención, el criterio esencial es por lo tanto bien la limitación del crecimiento celular inducido por un estrés, estrés celular provocado por la carencia de glucosa del medio de fermentación.

Por lo tanto esta estrategia se va a enfrentar bien contra el prejuicio técnico según el cual para aumentar el contenido de proteínas de la biomasa, es inevitablemente necesario aumentar esta biomasa y por lo tanto el crecimiento celular.

50 Como se hará a modo de ejemplo a continuación, de forma ventajosa se puede elegir limitar el crecimiento de *Chlorella sorokiniana* mediante una carencia de glucosa del medio de fermentación.

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.

La ralentización del crecimiento de dicha microalga también se produce modificando la temperatura de fermentación, por ejemplo aumentando de 1 a 5 °C aproximadamente, de preferencia aproximadamente 3 °C, con respecto a la temperatura óptima de fermentación. Esta temperatura óptima de fermentación es habitualmente de aproximadamente 28 °C.

5 Además, sin quedar ligado a una teoría cualquiera, la compañía Solicitante encontró que el flujo de glucosa normalmente se usa en las microalgas del género *Chlorella sorokiniana* de acuerdo con un orden de prioridad bien preciso:

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

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

15 La compañía Solicitante encontró por lo tanto que, para enriquecer la biomasa de microalgas con proteínas, es necesario limitar el crecimiento de la microalga y controlar su consumo de fuente nutritiva además del nitrógeno, por ejemplo de glucosa con el fin de:

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

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

20 De manera opcional, puede ser ventajoso avanzar hasta bloquear completamente toda síntesis de material de reserva, al actuar mediante el intermediario de inhibidores específicos.

En efecto se sabe que un cierto número de inhibidores de las vías de síntesis de los lípidos incluso del almidón (Hidratos de carbono de reserva por excelencia de las microalgas verdes):

- 25 - 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) se conocen históricamente como inhibidores potentes de las glicosidasas, de las glicosiltransferasas, de las glucógeno fosforilasas, o de la UDP-Galp mutasa.

30 Por lo tanto con el método 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 carencia del medio de fermentación en glucosa.

Esta segunda etapa permite enriquecer la biomasa con proteína. En particular, permite conseguir un contenido de proteínas de la biomasa superior a un 50, un 60, un 65 o un 70 % en peso (en eso de materia seca).

35 En un primer modo preferente de realización de acuerdo con la invención, el método de cultivo heterotrófico de dichas microalgas, en particular *Chlorella sorokiniana*, comprende:

- o una primera etapa de crecimiento de las microalgas, en la que la cantidad de glucosa en el medio (en modo discontinuo) o el caudal de suministro de glucosa (en modo continuo o semicontinuo) se ajusta a su capacidad de consumo, con el fin de obtener rápidamente una biomasa importante,
- 40 o una segunda etapa de producción de proteínas por las microalgas, en la que el caudal de suministro de glucosa se fija a un valor claramente por debajo de su capacidad de consumo de la glucosa, con el fin de impedir la acumulación suplementaria de sustancias de reserva, incluso favorecer su consumo.

Como se hará a continuación a modo de ejemplo, la primera etapa de crecimiento de las microalgas se puede realizar el modo discontinuo o "batch", en el que la glucosa proporcionada inicialmente es consumida totalmente por la microalga, lo que conduce a la producción de una biomasa de base.

45 La segunda etapa de producción de proteínas se produce en condiciones en las que se realiza:

- a) bien un suministro de medio completo en modos semicontinuo, denominado « fed-batch », después del consumo de la glucosa proporcionada inicialmente; los otros parámetros de realización de la fermentación permanecen sin cambios. En este caso como la glucosa se proporciona en modo continuo y la velocidad de suministro es entonces inferior a la velocidad de consumo que la cepa podría realizar de manera que el contenido residual de glucosa en el medio se mantiene nulo. El crecimiento de la cepa entonces se limita mediante la disponibilidad de glucosa (condición limitante de glucosa).
- 50 b) un funcionamiento en modo continuo de tipo quimioestático, en el que la tasa de crecimiento de la cepa ( $\mu$ ) se mantienen en su valor mínimo, el crecimiento de la cepa estando limitado por el suministro de glucosa. Este

modo de funcionamiento permite obtener una biomasa de gran contenido de proteínas gracias a la limitación de la glucosa y a la baja de tasa de crecimiento impuesta a la vez que se asegura una buena productividad.

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

5 **Ejemplos**

Ejemplo 1: Producción de *Chlorella sorokiniana* en fermentación de tipo « modo discontinuo secuencial » sin limitación del suministro de medio nutritivo

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

10 Cultivo previo:

- 600 ml de medio en un Erlenmeyer de 2 l;
- Composición del medio (tabla 1 que sigue a continuación)

Tabla 1.

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

15 El pH se ajusta a 7 antes de esterilización por adición de NaOH 8 N. La incubación se desarrolla en las siguientes condiciones:

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

20 El cultivo previo se transfiere a continuación a un fermentador de 30 l de tipo Sartorius.

*Cultivo para producción de biomasa:*

El medio es idéntico al del cultivo previo, pero la urea se sustituye por NH<sub>4</sub>Cl.

Tabla 2.

Macro elementos (g/l)	Glucosa	20
	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0,7
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,34
	Ácido cítrico	1,0
	$NH_4Cl$	1,88
	$Na_2SO_4$	0,2
	clerol FBA 3107 (antiespuma)	0,5
Micro elementos (mg/l)	$Na_2EDTA$	10
	$CaCl_2$	80
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	40
	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0,41
	$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	0,24
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,24
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5
	$H_3BO_3$	0,11
	$(NH_4)_6Mo_7O_{27} \cdot 4H_2O$	0,04

El volumen inicial ( $V_i$ ) del fermentador se ajusta a 13,5 l después de la siembra.

Se lleva a 16 - 20 l en 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 % en p/p
$pO_2$	> 20 % (mantenido con agitación)
Agitación	300 RPM mini
Caudal de aire	15 l/min

- 10 Cuando la glucosa proporcionada inicialmente se consume, un suministro de medio idéntico al medio inicial, sin el agente antiespuma, se realiza en forma de una solución 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, con el fin de obtener un contenido de glucosa de 20 g/l en el fermentador.

Otras adiciones idénticas se realizan de la misma manera en cada momento que la concentración residual de glucosa se convierte en nula.

El agente antiespuma Clerol FBA 3107 se añade a demanda para evitar una formación de espuma excesiva.

- 15 Resultados:

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

Ejemplo 2: Producción de *C. sorokiniana* en fermentación de tipo « cultivo semicontinuo » con suministro de glucosa limitante

5 En este ejemplo, un suministro de medio completo (modo « cultivo semicontinuo ») se inició después del consumo de la glucosa proporcionada inicialmente. Los otros parámetros de realización de la fermentación se mantienen sin cambios.

La glucosa se proporciona en modo continuo con la ayuda de una solución concentrada a 500 g/l. La velocidad de suministro es inferior a la velocidad de consumo que la cepa podría realizar de modo que el contenido residual de glucosa en el medio se mantiene nulo, es decir, el crecimiento de la cepa está limitado por la disponibilidad de glucosa (condición limitante de glucosa).

10 Esta velocidad aumenta en el transcurso del tiempo de forma exponencial. La fórmula que sirve para calcular el caudal de adición se caracteriza por un factor  $\mu$  que corresponde a la tasa de crecimiento que la cepa puede adoptar si consume toda la glucosa proporcionada:

$$S = S_0 \times \exp(\mu \cdot t)$$

*S = caudal de suministro de glucosa (en g/h)*

15 *S<sub>0</sub> = caudal de suministro inicial de glucosa, determinado en función de la biomasa presente al final del cultivo discontinuo. En las condiciones de los inventores es de 12 g/h.*

*$\mu$  = factor de aceleración del caudal. Debe ser inferior a 0,11 h<sup>-1</sup> que es la tasa de crecimiento de la cepa en ausencia de limitación nutricional.*

*t = duración del cultivo semi continuo (en h)*

20 Si es posible las sales se proporcionan en cultivo continuo, por separado o en mezcla con la glucosa. Pero también se pueden suministrar de forma secuencial en varias veces. La tabla 4 que sigue a continuación proporciona las necesidades de sales para 100 g de glucosa.

Tabla 4.

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

25 Las concentraciones de los otros elementos distintos a la glucosa se determinaron con el fin de que estuvieran en exceso con respecto a las necesidades nutricionales de la cepa.

El agente antiespuma Clerol FBA 3107 se añade a demanda para evitar una formación de espuma excesiva.

Resultados: efecto de la velocidad de suministro de glucosa durante el cultivo semicontinuo

30 Se realizan ensayos a diferentes velocidades de suministro de la glucosa en « cultivo semicontinuo ». se caracterizan por el  $\mu$  aplicado. El contenido de proteína de la biomasa obtenida se evalúa mediante la medición del

nitrógeno total expresado en N 6.25.

Tabla 5.

Ensayo	$\mu$ de alimentación (h <sup>-1</sup> )	Duración (h)	Biomasa (g/l)	Productividad (g/l/h)	% N 6,25
1	0,06	78	43,6	0,56	49,2
2	0,07	54	35,1	0,65	43,1
3	0,09	48	64,9	1,35	39,3

5 Estos resultados muestran que el hecho de trabajar con glucosa limitante permite aumentar el contenido de proteínas.

En efecto se observó que, incluso con un  $\mu$  elevado de 0,09, se obtiene un contenido de proteínas más elevado que el obtenido sin limitación como en el ejemplo 1 (un 39,3 % en lugar de un 36,2 %).

Acentuar la limitación del metabolismo por la glucosa comprende una mejora suplementaria del contenido de proteínas.

10 En las condiciones de estos ensayos, es necesario imponer a la cepa un  $\mu$  inferior a 0,06 h<sup>-1</sup> para obtener un contenido de proteínas superior a un 50 %.

Se debe indicar que esta condición va emparejada con una reducción de la productividad: 0,56 g/l/h en lugar de 1,35 g/l/h con el ensayo 3.

15 Ejemplo 3: Producción de *C. sorokiniana* en fermentación continua de tipo quimioestático con suministros de glucosa limitante

En este ejemplo, el fermentador usado es de 2 l de tipo Sartorius Biostat B.

Se realiza como en el ejemplo 2, pero con volúmenes 10 veces más bajos: el inoculo es de 60 ml y el volumen inicial de 1,35 l.

20 El suministro en modo continuo del medio se inició de acuerdo con el mismo principio que en el ejemplo 2, en este caso con las sales siendo mezcladas con glucosa en el aparato de distribución de alimentación. La velocidad de suministro se aceleró de acuerdo con la misma fórmula exponencial que en el ejemplo 2 aplicando un  $\mu$  de 0,06 h<sup>-1</sup>.

Modo quimioestático

Cuando se alcanza un volumen de 1,6 l, es decir, una concentración de biomasa de aproximadamente 50 g/l, el funcionamiento en modo continuo de tipo quimioestático se pone en práctica:

25 1. El fermentador se alimenta en modo continuo a un caudal de 96 ml/h con una solución de medio nutritivo a 100 g/l de glucosa de la siguiente composición:

Tabla 6.

Macro elementos (g/l)	Glucosa	100
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	6,75
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,7
	Ácido cítrico	5,0
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0

Micro elementos (mg/l)	Na <sub>2</sub> EDTA	50
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	400
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	200
	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2,1
	CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,2
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1,2
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,5
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,6
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>27</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,2

Las concentraciones de los otros elementos además de la glucosa se determinaron con el fin de que estuvieran en exceso con respecto a las necesidades nutricionales de la cepa.

- 5        2. Se extrajo medio en modo continuo del fermentador gracias a un tubo introducido unido a una bomba con el fin de mantener el volumen del cultivo a 1,6 l.

Por lo tanto, el medio se renovó con una fracción de 0,06 (6 %) por hora. Esta tasa de renovación se denomina tasa de dilución (D).

- 10      De acuerdo con el principio del cultivo en modo quimioestático, la tasa de crecimiento de la cepa ( $\mu$ ) se estableció con el mismo valor ya que el crecimiento de la cepa está limitado por el suministro de glucosa:

$$D = \mu = 0,06 \text{ h}^{-1}$$

#### Resultados

Después de 97 h de funcionamiento en modo quimioestático, la concentración de biomasa se estabiliza en 48 g/l +/- 2 g/l y el contenido de proteína en 53 +/- 2 %.

- 15      Este modo de funcionamiento permite obtener una biomasa de gran contenido de proteína gracias a la limitación de glucosa y a la baja tasa de crecimiento impuesta a la vez que se asegura una productividad muy buena, del orden de 2,9 g/l/h, gracias a la concentración elevada de biomasa.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método de enriquecimiento con proteínas de una microalga cultivada en heterotrofia, microalga del género *Chlorella*, caracterizado por que el cultivo heterotrófico comprende una etapa que tiene como objeto limitar el crecimiento de dicha microalga por una carencia del medio de fermentación de glucosa con un suministro de glucosa de modo continuo en cantidad insuficiente con el fin de obtener una tasa de crecimiento de la microalga inferior a la de dicha microalga en ausencia de limitación nutricional, y por un aumento de la temperatura de fermentación con respecto a la temperatura óptima de fermentación, permitiendo de ese modo conseguir un contenido de proteínas de la biomasa superior a un 50 % en peso.
- 10 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que la microalga del género *Chlorella* se elige entre el grupo constituido por *Chlorella sorokiniana* y *Chlorella protothecoides*.
3. Método de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado por que el cultivo heterotrófico de las microalgas de la especie *Chlorella sorokiniana* comprende:
- 15 a. una primera etapa de crecimiento de las microalgas, en la que el caudal de suministro de glucosa se ajusta a su capacidad de consumo, con el fin de obtener rápidamente una biomasa importante,
- b. una segunda etapa de producción de proteínas por las microalgas, en la que el caudal de suministro de glucosa se fija a un valor claramente por debajo de su capacidad de consumo de la glucosa, con el fin de impedir la acumulación suplementaria de sustancias de reserva, incluso favorecer su consumo.
- 20 4. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la temperatura de fermentación aumenta en 1, 2, 3, 4 o 5 °C con respecto a la temperatura óptima de fermentación.
5. Método de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado por que la temperatura de fermentación aumenta en aproximadamente 3 °C con respecto a la temperatura óptima de fermentación.
6. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la temperatura de fermentación es aproximadamente 31 °C.
- 25 7. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, caracterizado por que el aumento de la temperatura de fermentación conduce a aumentar, de preferencia duplicar, la capacidad de enfriamiento del intercambiador térmico del fermentador.