

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 424**

51 Int. Cl.:

C12N 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.07.2014 PCT/FR2014/051943**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.01.2015 WO15011428**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2014 E 14755879 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 3024924**

54 Título: **Procedimiento de fermentación de algas Chlorella en modo discontinuo alimentado mediante aportes secuenciales y automatizados de glucosa**

30 Prioridad:

26.07.2013 FR 1357387

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

25.02.2020

73 Titular/es:

**CORBION BIOTECH, INC. (100.0%)
One Tower Place, Suite 600
South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**SEGUEILHA, LAURENT;
LE RUYET, MARIE y
DELAROCHE, SYLVAIN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 744 424 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 fermentación de algas *Chlorella* en modo discontinuo alimentado mediante aportes secuenciales y automatizados de glucosa

5 La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento de producción de microalgas del género *Chlorella* mediante fermentación en modo discontinuo alimentado (denominado también "fed batch").

Presentación del estado de la técnica

Como tradicionalmente requieren "solamente agua y luz del sol" para crecer, las algas han sido consideradas desde hace mucho tiempo una fuente de alimento.

10 Existen diversas especies de algas que pueden ser utilizadas en alimentación, siendo la mayor parte de ellas "macroalgas" tales como las laminarias, la lechuga de mar (*Ulva lactuca*) y las algas rojas del tipo *Porphyra* (cultivadas en Japón) o "dulce" (*Palmaria palmata*).

Sin embargo, además de estas macroalgas, existen también otras fuentes de algas representadas por las "microalgas", es decir, algas microscópicas unicelulares, fotosintéticas o no, de origen marino u otro, cultivadas para su aplicación en biocombustibles o alimentación.

15 Por ejemplo, la espirulina (*Arthrospira platensis*) se cultiva en lagunas abiertas (mediante fototrofia) para su uso como complemento alimenticio o se incorpora en pequeñas cantidades en confitería o bebidas (generalmente menos de un 0,5 % peso/peso).

Otras microalgas ricas en lípidos, incluidas ciertas especies que pertenecen al género *Chlorella*, son también muy populares en los países asiáticos como complementos alimenticios.

20 Diversas especies de microalgas son capaces de pasar de un crecimiento fotoautótrofo (debido a la luz que suministra la energía para convertir el CO₂ en cadenas carbonadas) a un crecimiento heterótrofo (sin luz) utilizando glucosa u otros sustratos carbonados que se pueden usar para el metabolismo del carbono y de la energía.

A nivel industrial se usan en la actualidad tres procedimientos de producción de microalgas:

- en reactores heterótrofos (totalmente cerrados);
- 25 - en estanques al aire libre;
- en tubos de vidrio.

Mediante estos modos de cultivo se producen algas *Chlorella* con propiedades y composiciones variables. Su composición será diferente dependiendo de si se han producido con o sin luz, o al aire libre o no.

30 La producción y el uso de harina de microalgas del tipo *Chlorella* se describen, por ejemplo, en los documentos WO 2010/120923 y WO 2010/045368.

La fracción de aceites de la harina de microalgas, que puede estar compuesta esencialmente por aceites monoinsaturados, puede proporcionar ventajas nutricionales y de salud con respecto a los aceites saturados, hidrogenados y poliinsaturados que se encuentran frecuentemente en los productos alimentarios convencionales.

35 Cuando se desean fabricar a nivel industrial polvos de harina de microalgas a partir de una biomasa de las mismas, se siguen encontrando grandes dificultades, no solo desde el punto de vista tecnológico, sino también desde el punto de vista del perfil sensorial de las composiciones producidas.

En efecto, aunque están disponibles en el mercado polvos de algas fabricados, por ejemplo, con algas cultivadas fotosintéticamente en estanques exteriores o en fotobiorreactores, estos presentan un color verde oscuro (asociado a la clorofila) y un gusto fuerte y desagradable.

40 No obstante, generalmente se acepta que la formación y el desarrollo de los cloroplastos se suprimen en condiciones de cultivo heterotróficas y en la oscuridad.

En estas condiciones heterotróficas las microalgas, por tanto, no emplean la reacción de fotosíntesis sino que se desarrollan consumiendo los azúcares del medio de cultivo.

Las ventajas de este sistema de producción son las siguientes:

- 45 - una productividad en volumen mucho mayor, multiplicada por 100 con respecto a un sistema abierto, y por 10 con respecto a los fotobiorreactores,
- concentraciones de materia seca muy elevadas (de cientos de gramos por litro),

- costes de producción bajos,
 - productos obtenidos de calidad muy elevada,
 - un medio confinado y, por tanto, sin contaminación,
 - sin restricciones de localización,
- 5
- muy fácil de industrializar,
 - una tecnología controlada por completo a escala industrial en cuanto a levaduras y bacterias desde hace varias décadas, a diferencia de industrias como la química y la agroalimentaria,
 - ausencia de clorofila y, por tanto, gusto más neutro.
- 10
- En la bibliografía se han descrito convencionalmente dos modos de cultivo heterotrófico (por ejemplo, por H. IWAMOTO en Richmond, A. (Ed.), 2004, *Handbook of microalgal culture*. Blackwell, Oxford, 255-263).
- H. IWAMOTO indica que cuando la etapa de cultivo heterotrófico se controla en modo discontinuo o *batch* (aporte de toda la glucosa de una sola vez al inicio de la fermentación), la etapa de crecimiento exponencial va seguida de una etapa de maduración, a fin de obtener células ricas en compuestos de interés.
- La biomasa aumenta durante la etapa inicial, con consumo de glucosa, y después se detiene a glucosa cero.
- 15
- La segunda etapa, denominada de maduración, se aprovecha a continuación para favorecer la producción de otras moléculas de interés (pigmentos, lípidos...).
- El cultivo en modo discontinuo alimentado o *fed batch* (alimentación progresiva de glucosa) se efectúa generalmente en condiciones denominadas "limitantes de glucosa".
- 20
- El principio en el que se basa el método, tal como lo describe H. IWAMOTO, implica el aporte de glucosa como respuesta al consumo de la misma por las algas *Chlorella* en crecimiento.
- La concentración de glucosa en el medio de cultivo se analiza de modo continuo y automático y se mantiene en un 1,5 %.
- La alimentación de glucosa se detiene cuando se alcanza la densidad celular deseada. El cultivo se mantiene entonces en ese estado durante aproximadamente 10 horas a fin de favorecer la maduración celular.
- 25
- H. IWAMOTO ilustra la aplicación de este modo de cultivo discontinuo alimentado en condiciones limitantes de glucosa con una cepa de *Chlorella regularis*.
- El uso de un cultivo discontinuo alimentado de *Chlorella regularis* en el que el aporte de glucosa es controlado mediante la medición de la concentración de glucosa en el medio, es ilustrado también en el artículo de Sansawa *et al.* (*Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 98, N.º 6, 437-444, 2004). En la solicitud de patente EP 1 359 224, por otro lado, se describe un procedimiento de cultivo discontinuo alimentado de microorganismos marinos, en particular de dinoflagelados, que produce ácido docosahexaenoico.
- 30
- En H. IWAMOTO, el cultivo se efectúa durante un periodo de tiempo total de 40 h, dedicando las primeras 30 horas al crecimiento de las microalgas y su alimentación con glucosa.
- Las 10 horas siguientes se dedican a la maduración, sin aporte de glucosa.
- 35
- La biomasa se recoge después y se concentra mediante centrifugación, lavado, inactivación térmica (que permite inhibir la clorofilasa) a 130 °C durante 3 segundos, y se seca mediante atomización, a fin de obtener un polvo muy fino.
- No obstante, este modo de proceder se emplea sobre todo para reactivar la producción de clorofila y de carotenoides durante la etapa de maduración.
- 40
- No es adecuado para la producción de biomasa de *Chlorella* rica en lípidos sin defectos que alteren las propiedades organolépticas (término anglosajón de *off-notes*), y en particular sin producción de clorofila.
- Por otro lado, los dispositivos de análisis automático de la glucosa residual no son lo suficientemente fiables y no dan una respuesta lo suficientemente rápida (> 1 minuto) como para permitir una regulación fina de la fermentación.
- 45
- Sigue existiendo, por tanto, la necesidad no satisfecha de disponer de un método de producción eficaz mediante fermentación en modo discontinuo alimentado que no presente limitaciones de manejo de la glucosa residual.

Compendio de la invención

La empresa solicitante ha descubierto que era posible satisfacer esta necesidad proporcionando un procedimiento de producción de microalgas del género *Chlorella* mediante fermentación en modo discontinuo alimentado en el que los aportes de la fuente de carbono son secuenciales y automatizados en condiciones totalmente específicas, es decir, sometiendo el aporte de la fuente de carbono mediante adiciones secuenciales al valor de la presión de oxígeno disuelto (pO_2) del medio de fermentación.

La presente invención se refiere, por tanto, a un procedimiento de producción de microalgas del género *Chlorella* mediante fermentación en modo discontinuo alimentado (o *fed batch*), caracterizado por que el aporte de la fuente de carbono se efectúa de forma secuencial y automática en respuesta a una reducción del consumo de oxígeno por las microalgas.

El objeto de la presente invención viene definido por las reivindicaciones.

La microalga se puede seleccionar entre el grupo constituido por *Chlorella protothecoides*, *Chlorella sorokiniana* y *Chlorella vulgaris*. Preferiblemente, la microalga es *Chlorella protothecoides*.

La fuente de carbono es la glucosa.

La reducción del consumo de oxígeno de la microalga se puede detectar midiendo la presión de oxígeno disuelto en el medio. Puesto que un aumento de esta presión se traduce en una reducción del consumo, el aporte de la fuente de carbono se puede activar cuando la presión de oxígeno disuelto en el medio de fermentación (pO_2) supere un valor umbral.

Este valor umbral es de un 10 a un 80 % superior a la pO_2 en el medio de fermentación cuando la concentración de la fuente de carbono en el medio de fermentación no es limitante.

Durante la activación, la glucosa es aportada durante un periodo de tiempo de menos de 10 minutos para alcanzar una concentración de 1 a 20 g/l de glucosa en el medio de fermentación.

Preferiblemente, el valor de la pO_2 fijado cuando la concentración de la fuente de carbono en el medio de fermentación no es limitante es de un 20 a un 40 % y, de manera particularmente preferible, de aproximadamente un 30 %.

Preferiblemente, el periodo de tiempo entre el momento en el que se ha consumido por completo la fuente de carbono y un aporte de la fuente de carbono es inferior a 5 minutos, de manera particularmente preferible, inferior a 1 minuto.

La fuente de carbono residual se mantiene preferiblemente de forma permanente, o de forma casi permanente, en un valor superior a 0 e inferior a 20 g/l, preferiblemente inferior a 10 g/l.

Preferiblemente, el aporte de la fuente de carbono se efectúa empleando una bomba cuyo caudal máximo permite añadir de 10 a 20 g/l de la fuente de carbono al medio de fermentación en menos de 10 minutos.

Descripción detallada de la invención

Al contrario que el prejuicio técnico según el cual, en el caso de una fermentación en modo discontinuo alimentado, se debe mantener la concentración de glucosa residual entre 5 y 15 g/l mediante un aporte continuo de glucosa regulado por la medición automática de la glucosa residual en el medio, la empresa solicitante ha aprovechado la observación según la cual cuando la glucosa en el medio de fermentación se ha consumido por completo, la pO_2 aumenta rápidamente.

La empresa solicitante automatiza así los aportes de la fuente de carbono programando la bomba de alimentación de glucosa a fin de que esta active el pulso de glucosa a cada aumento de la pO_2 y no cuando la concentración de glucosa residual sea inferior a 5 g/l.

En otras palabras, la bomba de alimentación de glucosa se activa cuando el valor medido de la pO_2 es superior a un valor umbral fijado con respecto a la pO_2 medida cuando la concentración de glucosa residual no es limitante.

Esto se traduce por el hecho de que la detección del aumento de la pO_2 por encima de un valor umbral fijado activa la puesta en marcha, preferiblemente a su velocidad máxima, de la bomba de alimentación de glucosa durante un tiempo determinado (preferiblemente inferior a 10 minutos) a fin de aportar una cantidad de glucosa correspondiente a una concentración comprendida entre 1 y 30 g/l, preferiblemente de aproximadamente 10 g/l, llevada al volumen inicial del fermentador.

Mediante este procedimiento, es la microalga la que "gestiona" de forma directa y automática sus necesidades de glucosa.

Con respecto al procedimiento de fermentación en modo discontinuo alimentado con una alimentación continua de la fuente de carbono, el procedimiento de la invención presenta varias ventajas:

- no necesita ninguna intervención humana dado que permite una regulación fina y automática de la fermentación, tal como se demuestra en la parte experimental;
- 5 - los aportes de la fuente de carbono se efectúan según las necesidades de los microorganismos. Así, el medio de fermentación no puede acumular, en ningún caso, una cantidad de glucosa superior a la definida por los pulsos o, al contrario, no puede encontrarse durante un tiempo prolongado con una glucosa residual nula. Estos dos parámetros son primordiales para asegurar la calidad del producto final, particularmente la ausencia de *off-notes*, es decir, de características organolépticas alteradas;
- 10 - la glucosa residual se controla mucho mejor y el protocolo de fermentación, por tanto, es más resistente y más reproducible;
- la productividad es máxima, sin subalimentación de glucosa y sin acumulación de glucosa en concentraciones que inhiban el metabolismo de la microalga.

15 Tal como se usa en la presente memoria, el término "*productividad*" corresponde a la cantidad de biomasa fabricada por litro y por hora de fermentación en modo discontinuo alimentado.

El "*rendimiento de conversión Yx/s*" representa convencionalmente la relación entre la biomasa formada y la glucosa consumida. Sin embargo, en el sentido de la invención, a fin de comparar los diferentes protocolos ensayados, particularmente en la parte experimental, y evaluar el impacto de las modificaciones en el rendimiento, la empresa solicitante ha seleccionado racionalizar este parámetro determinando el valor del rendimiento para la producción de un 45 % de ácidos grasos producidos (en p/p seco de biomasa).

La presente invención se refiere, por tanto, a un procedimiento de producción de microalgas del género *Chlorella* mediante fermentación en modo discontinuo alimentado (o *fed batch*), caracterizado por que el aporte de la fuente de carbono se efectúa de forma secuencial y automática en respuesta a una reducción del consumo de oxígeno por la microalga.

25 La fuente de carbono es la glucosa.

Las expresiones "fermentación en modo discontinuo alimentado" o "fermentación *fed batch*" se pueden usar de forma intercambiable. En este modo de fermentación, después de un inicio de fermentación discontinua, es decir, sin aporte, se añade una fuente de carbono a lo largo de todo el proceso de fermentación hasta la obtención de una cantidad de biomasa definida.

30 Al contrario que los procedimientos en modo discontinuo alimentado de la técnica anterior, en los que el aporte de la fuente de carbono se efectúa mediante una alimentación continua, en el procedimiento según la invención el aporte de la fuente de carbono se efectúa mediante adiciones secuenciales o "pulsos".

Estas adiciones secuenciales o "pulsos" consisten, para cada una, en la adición de una gran cantidad de una solución concentrada de la fuente de carbono, preferiblemente un jarabe de glucosa, en un tiempo relativamente corto, inferior a 10 min y, de manera particularmente preferible, de aproximadamente 6 min, para alcanzar la concentración deseada en el mosto de fermentación. La concentración deseada en el mosto de fermentación está comprendida entre 1 y 20 g/l y preferiblemente entre 10 y 20 g/l. Según una realización particular, la concentración deseada de la fuente de carbono en el mosto de fermentación es de aproximadamente 10 g/l. Tal como se usa en la presente memoria, el término "aproximadamente" se refiere a un valor $\pm 20\%$, 10% , 5% o 2% .

40 Como se ilustrará más adelante en la presente memoria, en cuanto se ha consumido por completo la glucosa en el medio y aumenta, por tanto, la pO_2 , se alimenta con una solución de glucosa concentrada, por ejemplo de 700 g/l, durante un periodo de tiempo de menos de 10 minutos, para alcanzar una concentración de 1 y 20 g/l de glucosa en el medio de fermentación. El aporte de glucosa se interrumpe a continuación durante el tiempo de consumo de la glucosa residual. Una vez que esta se ha consumido, la pO_2 aumenta lo que activa un nuevo aporte de glucosa y así sucesivamente.

45 Como se ha mencionado previamente, estas adiciones no requieren ninguna intervención humana particular, contrariamente a la adición continua durante la cual hay que asegurar que el caudal de alimentación de glucosa se corresponda al menos con las necesidades metabólicas de la cepa (véase la Figura 1). En efecto, una vez consumida la glucosa, el consumo de oxígeno del medio de fermentación por la microalga se reducirá bruscamente. Así, siguiendo la regulación PID ("proporcional, integral y derivativa") de la agitación o del caudal de aire o de la contrapresión de la cúpula o del aporte de O_2 , se producirá un aumento significativo de unos pocos tantos por ciento de la pO_2 . En el procedimiento según la invención, este aumento es el que activa automáticamente un aporte de glucosa.

El aporte de la fuente de carbono se efectúa empleando una bomba cuyo caudal máximo permite preferiblemente

añadir de 10 a 20 g/l de la fuente de carbono al medio de fermentación en menos de 10 minutos.

El aporte de la fuente de carbono se efectúa en cuanto la pO_2 supera un valor umbral que es de un 10 a un 80 %, o preferiblemente de un 15 a un 70 %, superior al valor de la pO_2 fijado cuando la concentración de la fuente de carbono en el medio de fermentación no es limitante. Según una realización particular, el aporte de la fuente de carbono se efectúa en cuanto la pO_2 supera un valor umbral que es de un 10 a un 20 % y preferiblemente de aproximadamente un 15 %, superior al valor de la pO_2 fijado cuando la concentración de la fuente de carbono en el medio de fermentación no es limitante. Según otra realización particular, el aporte de la fuente de carbono se efectúa en cuanto la pO_2 supera un valor umbral que es de un 50 a un 80 %, más preferiblemente aún de un 60 a un 70 % y, de manera particularmente preferible, de aproximadamente un 65 %, superior al valor de la pO_2 fijado cuando la concentración de la fuente de carbono en el medio de fermentación no es limitante.

A modo de ejemplo, una concentración de glucosa no limitante puede ser una concentración comprendida entre 5 y 15 g/l. El valor de la pO_2 cuando la concentración de la fuente de carbono en el medio de fermentación no es limitante, dependerá de varios parámetros, entre ellos la regulación PID ("proporcional, integral y derivativa") de la agitación o del caudal de aire o de la contrapresión de la cúpula o del aporte de O_2 . Estos parámetros son preferiblemente constantes a lo largo de toda la etapa de fermentación destinada a aumentar la biomasa. Así, las variaciones de la pO_2 reflejan fielmente las variaciones del consumo de oxígeno de la microalga.

El valor de la pO_2 cuando la concentración de la fuente de carbono en el medio de fermentación no es limitante es normalmente de un 20 a un 40 % y preferiblemente de aproximadamente un 30 %.

Según una realización particular, el valor de la pO_2 cuando la concentración de la fuente de carbono en el medio de fermentación no es limitante es de aproximadamente un 30 %, preferiblemente de un 30 %, y el valor umbral que activa un aporte de la fuente de carbono está comprendido entre aproximadamente un 35 % y aproximadamente un 55 %, preferiblemente entre un 35 % y un 55 %. Según otra realización particular, el valor de la pO_2 cuando la concentración de la fuente de carbono en el medio de fermentación no es limitante, es de aproximadamente un 30 %, preferiblemente de un 30 %, preferiblemente de un 30 %, y el valor umbral que activa un aporte de la fuente de carbono es de aproximadamente un 35 %, preferiblemente de un 35 %.

Preferiblemente, el periodo de tiempo entre el momento en el que se ha consumido por completo la fuente de carbono y un aporte de la fuente de carbono en el medio de fermentación es inferior a 5 minutos, de manera muy particularmente preferible, inferior a 1 minuto. Como se ha indicado previamente, el consumo completo de la fuente de carbono conlleva una reducción drástica del consumo de oxígeno que se detecta por la medición del valor de la pO_2 en el medio de fermentación, con una sonda específica, reflejando el aumento de la pO_2 una reducción del consumo de oxígeno y, por tanto, una carencia de la fuente de carbono en el medio.

Este tiempo de reacción, por tanto, permite mantener la fuente de carbono residual de forma casi constante en un valor superior a 0 e inferior a 20 g/l, preferiblemente superior a 0 e inferior a 10 g/l, sin riesgo de limitación o de inhibición del metabolismo por la glucosa.

La microalga puede ser cualquier *Chlorella* adecuada para una fermentación en modo discontinuo alimentado. Según una realización, la microalga se selecciona del grupo constituido por *Chlorella protothecoides*, *Chlorella sorokiniana* y *Chlorella vulgaris*. Preferiblemente, la microalga es *Chlorella protothecoides*. Según una realización particular, la microalga es *Chlorella protothecoides* UTEX 250 (Colección de cultivos de algas de la Universidad de Tejas en Austin - EE.UU.).

La invención se comprenderá mejor con la ayuda de los ejemplos que siguen, los cuales se pretende que sean ilustrativos y no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1. Producción de *Chlorella protothecoides* rica en lípidos utilizando dos métodos de aporte de la glucosa

La cepa empleada es *Chlorella protothecoides* UTEX 250 (Colección de cultivos de algas de la Universidad de Tejas en Austin - EE.UU.).

Precultivo:

- 500 ml de medio en un Erlenmeyer de 2 l ;

- Composición del medio (en g/l):

| | | |
|--------------------------------------|---|-------|
| Macroelementos (g/l) | Glucosa | 40 |
| | K ₂ HPO ₄ | 3 |
| | Na ₂ HPO ₄ | 3 |
| | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,25 |
| | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1 |
| | Ácido cítrico | 1 |
| | Clerol FBA 3107 (antiespumante) | 0,1 |
| Microelementos y Vitaminas (mg/l) | CaCl ₂ ·2H ₂ O | 30 |
| | FeSO ₄ ·7H ₂ O | 1 |
| | MnSO ₄ ·1H ₂ O | 8 |
| | CoSO ₄ ·7H ₂ O | 0,1 |
| | CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0,2 |
| | ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0,5 |
| | H ₃ BO ₃ | 0,1 |
| | Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0,4 |
| | Tiamina HCl | 1 |
| | Biotina | 0,015 |
| | B12 | 0,01 |
| | panotenoato de calcio | 0,03 |
| | Ácido p-aminobenzoico | 0,06 |

La incubación se lleva a cabo en las siguientes condiciones: duración: 72 h; temperatura: 28 °C; agitación: 110 r.p.m. (Incubador Infors Multitron).

El precultivo se transfiere inmediatamente a un fermentador de 30 l de tipo Sartorius.

5 **Cultivo para la producción de biomasa:**

El medio base es el siguiente:

| | | |
|--------------------------------------|---|--------------------------------------|
| Macroelementos (g/l) | Glucosa | 40 |
| | KH ₂ PO ₄ | 0,9 |
| | NaH ₂ PO ₄ | 0,7 |
| | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 1,7 |
| | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0,2 |
| | Clerol FBA 3107 (antiespumante) | 0,3 |
| | Microelementos y Vitaminas (mg/l) | CaCl ₂ ·2H ₂ O |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 6 | |
| MnSO ₄ ·1H ₂ O | 20 | |
| CoSO ₄ ·7H ₂ O | 0,05 | |

| | |
|---|------|
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0,3 |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 25 |
| H ₃ BO ₃ | 7 |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 1 |
| Inositol | 100 |
| Cloruro de colina | 100 |
| Tiamina HCl | 3 |
| Biotina | 0,05 |
| B12 | 0,03 |
| pantotenato de calcio | 0,1 |
| Ácido p-aminobenzoico | 0,1 |

El volumen inicial (Vi) del fermentador se ajusta a 7 l tras la inoculación. Se lleva hasta 15-20 l de volumen final.

Los parámetros para llevar a cabo la fermentación son los siguientes:

| | |
|-----------------|---|
| Temperatura | 28 °C |
| pH | 6,8 (ensayos 1 y 2) o 5,2 (ensayos 3 y 4) con NH ₃ al 28 % p/p y después KOH 5 N |
| pO ₂ | 30 % (mantenido mediante agitación) |
| Agitación | 300 r.p.m. mín. |
| Caudal de aire | 15 l/min |

5 Modo de aporte de la glucosa

De forma convencional, cuando la concentración residual de glucosa cae por debajo de 10 g/l, se efectúa una adición de glucosa a fin de mantener el contenido de glucosa entre 0 y 20 g/l en el fermentador.

Este aporte se efectúa a partir de una solución de glucosa concentrada de 700 g/l, que es transferida al fermentador empleando una bomba peristáltica.

10 El aporte de glucosa se gestiona según dos métodos diferentes:

1) *Protocolo 1: aporte de glucosa en continuo con velocidad ajustada manualmente (ensayos 1 y 3)*

En este tipo de alimentación, la bomba funciona de forma permanente.

Puesto que la evolución de las necesidades de glucosa de la cepa a lo largo de la fermentación se ha modelizado, se programa un perfil de evolución modelo del caudal de la bomba (véase la Figura 1, curva "% bomba modelo").

15 No obstante, debido a que los caudales (del orden de 20 g/l como máximo) y las cantidades acumuladas de glucosa (de aproximadamente 1000 g/l) son muy elevados, una diferencia pequeña (inferior a la precisión del modelo) entre el caudal aplicado y la velocidad real de consumo de la cepa genera rápidamente una variación grande de la glucosa residual.

20 Como muestra la Figura 1, son frecuentemente necesarios, por tanto, ajustes manuales (véase la Figura 1, curva "% bomba real") a lo largo del cultivo para mantener la glucosa residual (véase la Figura 1, curva "glucosa residual") en el intervalo deseado sin poder obtener una estabilidad perfecta.

Este método requiere, por tanto, un control permanente por parte de un operador y el metabolismo de la cepa está limitado a veces por la disponibilidad de la glucosa.

2) *Protocolo 2: aporte de glucosa mediante adiciones secuenciales y automáticas en función de la pO₂ (ensayos 2 y 4)*

5 Mediante el procedimiento según la invención, las adiciones de glucosa son secuenciales y automatizadas por medio de un algoritmo que controla el funcionamiento de la bomba a partir de la medición del contenido de oxígeno disuelto (pO₂) en el medio de fermentación con una sonda específica.

El principio del control se presenta en la Figura 2.

Cuando la concentración de glucosa cae a 0 g/l en el fermentador, el consumo de oxígeno de la cepa disminuye considerablemente de modo que la pO₂ aumenta rápidamente a pesar de la reducción de la agitación que se ha activado por el algoritmo de regulación de la pO₂.

10 La detección del aumento de la pO₂ por encima del umbral determinado (35 %) activa la puesta en marcha de la bomba de alimentación de glucosa a su velocidad máxima durante un tiempo determinado (6 minutos) a fin de aportar una cantidad de glucosa correspondiente a una concentración seleccionada (10 g/l, llevada al volumen inicial del fermentador).

15 En este ejemplo, el periodo de tiempo entre el consumo completo de la glucosa y la nueva adición es inferior a un minuto.

La glucosa residual, por tanto, se mantiene de forma permanente en un valor superior a 0 e inferior a 10 g/l, sin riesgo de limitación o de inhibición del metabolismo por la glucosa.

Al contrario que el protocolo manual, la velocidad de la fermentación no ha sido ralentizada en ningún momento por la glucosa.

20 Además, este método está totalmente automatizado y funciona sin que sea necesaria la vigilancia humana.

Etapa de enriquecimiento en lípidos

En todos los casos, cuando se han consumido 1000 g de glucosa y la biomasa ha alcanzado una concentración de 70 g/l, el amoníaco se sustituye por potasa para la regulación del pH. Esto permite a la biomasa acumular lípidos:

Resultados:

| Ensayo | Alimentación de glucosa | Concentración de glucosa residual (g/l) | pH | Duración (h) | Biomasa (g/l) | % Lípidos |
|--------|---|---|-----|--------------|---------------|-----------|
| 1 | Adición continua con ajustes manuales (Protocolo 1) | 0-30 | 6,8 | 96 | 177 | 45,4 |
| 2 | Adiciones secuenciales y automáticas (Protocolo 2) | 0-10 | 6,8 | 86 | 175 | 45,3 |
| 3 | Adición continua con ajustes manuales (Protocolo 1) | 0-30 | 5,2 | 94,5 | 182 | 44,6 |
| 4 | Adiciones secuenciales y automáticas (Protocolo 2) | 0-10 | 5,2 | 88,8 | 176 | 44,5 |

25 El protocolo 2 según la invención, es decir, el aporte de glucosa mediante adiciones secuenciales y automáticas, permite aumentar la productividad. En efecto, se necesita menos tiempo de fermentación para alcanzar los 70 g/l de biomasa con el procedimiento según la invención. Esta diferencia se puede explicar por el hecho de que la cepa gestiona ella misma el aporte de glucosa y de que su metabolismo, por tanto, no está limitado nunca.

30 Asimismo, las diferencias de las concentraciones de la glucosa residual son menores con el procedimiento según la invención.

Ejemplo 2: Producción de *Chlorella protothecoides* rica en lípidos con adición de glucosa por pulsos cuando la pO₂ alcanza un 50 % de la saturación

El medio de cultivo y las condiciones de operación son idénticos a los del ensayo 1 del ejemplo 1:

| | |
|-----------------|---|
| Temperatura | 28 °C |
| pH | 6,8 con NH ₃ al 28 % p/p y después KOH 5 N |
| pO ₂ | 30 % (mantenido mediante agitación) |
| Agitación | 300 r.p.m. mín. |
| Caudal de aire | 15 l/min |

- 5 Como en el Ejemplo 1, las adiciones de glucosa son secuenciales y automatizadas por medio de un algoritmo que controla el funcionamiento de la bomba a partir de la medición del contenido de oxígeno disuelto (pO₂) con una sonda específica.

Aunque el umbral de pO₂ que activa la adición de glucosa es en este caso más elevado: un 50 % de la saturación en lugar de un 35 % de la saturación.

- 10 Es decir, por tanto, un valor umbral de activación un 67 % superior a la presión de oxígeno disuelto en el medio de fermentación cuando la concentración de la fuente de carbono en el medio de fermentación no es limitante.

El gráfico presentado en la Figura 3 da un ejemplo de realización del pulso. Cuando la concentración de glucosa cae a un valor próximo a 0 g/l en el fermentador, el consumo de oxígeno de la cepa disminuye considerablemente de modo que la pO₂ aumenta rápidamente. La agitación en este caso se mantiene a 400 r.p.m.

- 15 La detección del aumento de la pO₂ por encima del 50 % de la saturación (es decir un 67 % más que el valor antes de que la glucosa llegue a ser limitante) activa la puesta en marcha de la bomba de alimentación de glucosa a su velocidad máxima.

Resultados finales de este ensayo:

- Duración: 90 h
- Biomasa: 176 g/l
- Contenido de lípidos: 45,1 %

Así, a pesar de la elevación del umbral de activación de la adición (un 50 % de la saturación con respecto a un 35 % en el ejemplo 1), los pulsos se efectúan muy rápidamente tras el agotamiento de la glucosa y la duración del cultivo para alcanzar la concentración de biomasa deseada no aumenta con respecto al Ejemplo 1.

- 25 **Descripción de las Figuras:**

FIGURA 1: Alimentación continua de glucosa con ajuste manual

FIGURA 2: Alimentación de glucosa mediante adiciones secuenciales y automáticas - valor umbral de la activación: pO₂ = 35 % (es decir un 16,7 % superior al valor obtenido cuando la concentración de la fuente de carbono en el medio de fermentación no es limitante).

- 30 FIGURA 3: Alimentación de glucosa mediante adiciones secuenciales y automáticas - valor umbral de la activación: pO₂ = 50 % (es decir un 67 % superior al valor obtenido cuando la concentración de la fuente de carbono en el medio de fermentación no es limitante).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de producción de microalgas del género *Chlorella* mediante fermentación en modo discontinuo alimentado (denominado *fed batch*), caracterizado por que el aporte de glucosa se efectúa de forma secuencial y automática en respuesta a una reducción del consumo de oxígeno por la microalga, en donde el aporte de glucosa se activa cuando la presión de oxígeno disuelto en el medio de fermentación (pO_2) supera un valor umbral predefinido que es de un 10 a un 80 % superior al valor de la pO_2 fijado cuando la concentración de glucosa en el medio de fermentación no es limitante, y en donde durante la activación la glucosa es aportada durante un periodo de tiempo de menos de 10 minutos para alcanzar una concentración de 1 a 20 g/l de glucosa en el medio de fermentación.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en donde el valor de la pO_2 fijado cuando la concentración de glucosa, en el medio de fermentación no es limitante es de un 20 a un 40 %, preferiblemente de aproximadamente un 30 %.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en donde la microalga del género *Chlorella* se selecciona del grupo constituido por *Chlorella protothecoides*, *Chlorella sorokiniana* y *Chlorella vulgaris*.
- 15 4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la microalga es *Chlorella protothecoides*.
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el periodo de tiempo entre el momento en el que se ha consumido por completo la glucosa y un aporte de glucosa es inferior a 5 minutos, preferiblemente inferior a 1 minuto.
- 20 6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la glucosa residual se mantiene de forma permanente en un valor superior a 0 e inferior a 20 g/l.
7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el aporte de glucosa se efectúa empleando una bomba cuyo caudal máximo permite añadir de 10 a 20 g/l de glucosa al medio de fermentación en menos de 10 minutos.

25

Figura 1

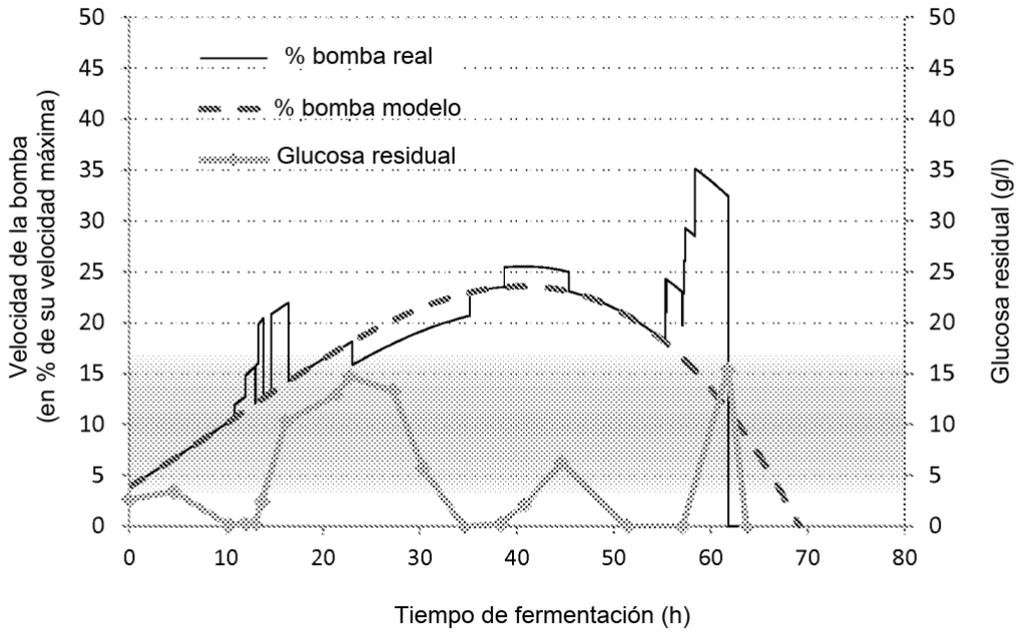


Figura 2

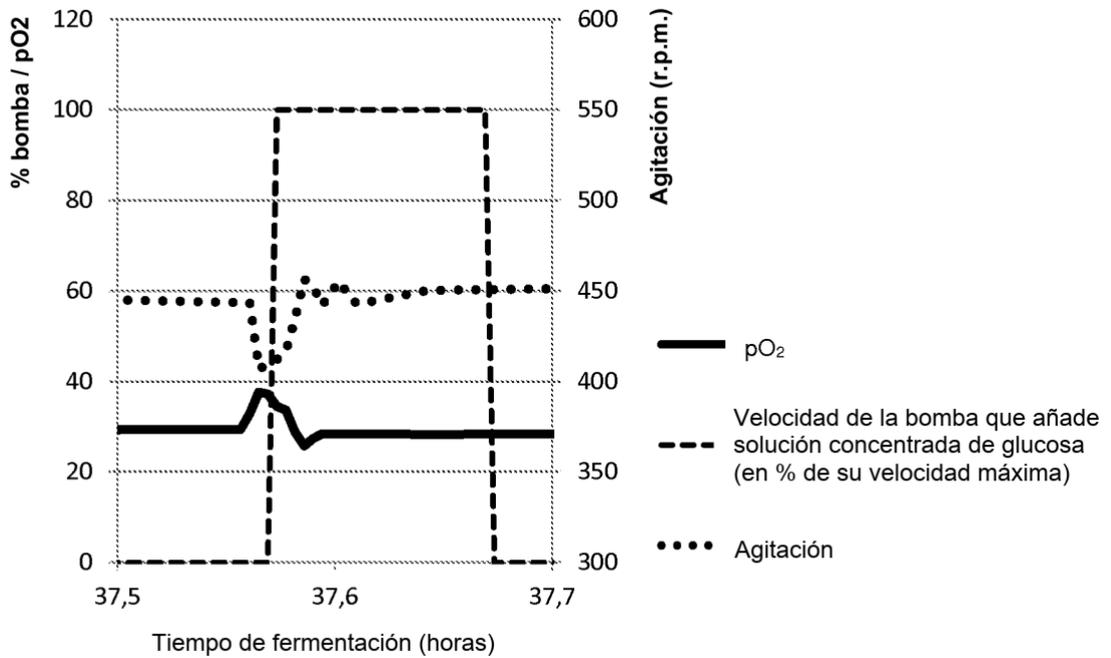


Figura 3

