

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 158**

51 Int. Cl.:

C12R 1/89 (2006.01)

C12N 1/00 (2006.01)

C12N 1/04 (2006.01)

C12N 1/12 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2014** **E 14004143 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019** **EP 3031932**

54 Título: **Una nueva microalga Chlorella para la producción de aceite vegetal para biodiesel y unidades de energía de cogeneración**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.04.2020

73 Titular/es:

MAGRI, MICHAEL (100.0%)
Via Castelnuovo Rangone, 4/80
41050 Formigine (Modena), IT

72 Inventor/es:

MAGRI, MICHAEL

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 755 158 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

Una nueva microalga *Chlorella* para la producción de aceite vegetal para biodiesel y unidades de energía de cogeneración

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere al campo de la bioenergía renovable, y en particular aborda un método novedoso de producción de biodiesel a través del cultivo en dos etapas de *Chlorella Vulgaris*.

Antecedentes de la técnica

Se sabe que la utilización industrial de microorganismos, cianobacterias y particularmente microalgas está limitada por el alto costo de los sistemas de cultivo.

- 10 Exceptuando algunos casos particulares (producción de productos de alto valor como las microalgas marcadas), la producción industrial de microalgas y derivados requiere plantas que puedan producir cientos o miles de kilogramos de biomasa por año.

En campos particulares, tales como alimentos y biocombustibles, el rendimiento requerido es de cientos o miles de toneladas de biomasa por año.

- 15 Dado que el rendimiento de los sistemas de cultivo para microorganismos fototróficos, o fotobiorreactores, rara vez supera los 2 gramos por litro por día, las plantas industriales para el crecimiento de microalgas deben usar sistemas de cultivo que puedan contener decenas o cientos de metros cúbicos de cultivo.

Los problemas surgen de limitaciones técnicas y biológicas, incluida la necesidad de microalgas que puedan superar considerablemente los 2 gramos/litro.

- 20 El término biodiésel designa en particular cadenas largas de ésteres monoalquílicos obtenidos a partir de ácidos grasos a través de un proceso de transesterificación.

En la actualidad, las microalgas se encuentran entre las fuentes más interesantes y sostenibles para la producción de biodiesel.

Existen dos tipos de cultivo a gran escala: cultivo fototrófico y fermentación heterotrófica.

- 25 El cultivo fototrófico consiste en suministrar luz y CO₂ a las microalgas.

Debido al efecto de ensombrecimiento mutuo causado por el aumento de la concentración celular, la síntesis de lípidos es limitada.

En condiciones heterotróficas, siempre que se encuentre la cantidad adecuada del carbono orgánico que ha de ser suministrado, se pueden sintetizar grandes cantidades de lípidos.

- 30 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 es una tabla de crecimiento para una microalga *Chlorella Vulgaris*;

la Figura 2 es una tabla de crecimiento para una microalga *Chlorella Vulgaris Mod*;

la Figura 3 es una representación fotográfica del cloroplasto durante el proceso de crecimiento.

- 35 Con referencia a las figuras, la microalga de la presente invención presenta una productividad lipídica mucho mayor que *Chlorella Vulgaris* tal como se muestra en la tabla de la Figura 1 y *Chlorella Vulgaris* definida Mod por simplicidad en la Figura 2. En la misma fecha y hora se inició una prueba comparativa bajo las mismas condiciones de prueba y, en el día 8, *Chlorella Vulgaris Mod* había aumentado sus células a 340,2 millones, mientras que *Chlorella Vulgaris* solo aumentó en 9,8 millones.

Descripción detallada de la presente invención

- 40 La microalga de la invención se deriva de *Chlorella Vulgaris* y puede producir hidrocarburos alifáticos ligeros que tienen 16-26 carbonos, y tiene la propiedad peculiar de poder crecer tanto en condiciones de cultivo fototrófico como de fermentación heterotrófica, a diferencia de muchos otros tipos de microalgas que solo crecen bajo una de las dos condiciones.

- 45 La sostenibilidad del proceso depende de varios factores: el crecimiento del cultivo fototrófico debe usar CO₂ derivado de humos de combustión, de motor o de horno de metano, la luz debe ser luz solar y no puede ser luz artificial, el agua debe ser agua de pozo y no provenir de la red de abastecimiento de agua.

Si las algas fueran solo fototróficas, por la noche tendrían que ser iluminadas con luz artificial, a un alto costo, pero, dado que también son heterotróficas, se alimentan con subproductos que contienen glucosa y, por lo tanto, se pueden fermentar en tanques.

5 El desarrollo completo de este proceso requiere microalgas de alto rendimiento y alto contenido de lípidos, por lo tanto, se seleccionó *Chlorella Vulgaris* para maximizar la utilización de su potencial.

Este estudio se ha realizado con el objetivo de aumentar su productividad natural y sin cambio genético se ha descubierto el método descrito a continuación: algunas especies de algas son más ricas en compuestos ventajosos para las industrias nutraceuticas y farmaceuticas, mientras que otras especies son más ricas en aceite vegetal y, por lo tanto, son interesantes para los biocombustibles.

10 Los datos que permiten la selección de las diversas cepas para la producción de biodiesel son la concentración de biomasa alcanzable y el contenido de aceite que pueden producir las microalgas, sobre una base de peso seco.

Por lo tanto, la selección de la cepa de algas se realizará de acuerdo con las características más útiles para la producción final deseada.

15 Por otro lado, para que las algas acumulen aceite, deben estar expuestas a condiciones de estrés, hasta el punto de inducir comportamientos de emergencia.

En particular, la relación carbono/nitrógeno se ha de aumentar, es decir, la biomasa ha de ser despojada de nutrientes nitrogenados o el sistema ha de ser despojada de fósforo.

Una de las características más interesantes, además de la concentración y el porcentaje de lípidos que finalmente se convertirán en combustible, es la reproducibilidad.

20 El efecto de la radiación luminosa es importante tanto para el crecimiento de las algas como para la producción de aceite, y por esta razón se han utilizado fotobiorreactores que podrían diferenciar la absorción de la luz de acuerdo con los parámetros más útiles para el crecimiento.

25 Esta tecnología novedosa, que nunca ha sido utilizada en ninguna planta existente, proporciona un aumento considerable del rendimiento. Sin embargo, para optimizar la absorción de la luz en toda la masa de algas, se ha tenido que desarrollar un alga de la misma cepa con características mejoradas.

Esto se debe a que las capas de algas más internas en los fotobiorreactores apenas reciben una corriente adecuada de fotones.

Esta cepa de algas de tercera generación ha sido el resultado de muchos años de investigación.

30 Por lo tanto, para cada cepa de algas se ha desarrollado un "alga colaborativa" de tercera generación correspondiente, es decir, el gemelo del alga natural (es decir, silvestre), por selección natural.

Para una mejor comprensión de la ventaja de esta innovación se ha de tener en cuenta que la luz es capturada en el cloroplasto, que es en cierto modo la boca, mientras que la síntesis y el almacenamiento de lípidos se produce en el citoplasma, que actúa como un estómago.

35 La modificación consiste básicamente en reducir el tamaño del cloroplasto, de modo que no pueda absorber una cantidad excesiva de luz, y en aumentar el volumen del citoplasma, para almacenar una mayor cantidad de lípidos.

En resumen, una boca grande causaría indigestión, con regurgitación y desperdicio de alimentos, mientras que una boca pequeña permitiría al estómago usar todo el alimento ingerido, dejando también parte del mismo para las otras algas, de modo que no se desperdiciaría nada.

40 El tamaño del cloroplasto se reduce por inmersión en un tanque que contiene un gel conductor soluble en agua que permite que las microalgas sobrevivan, estando rodeado el tanque por transductores ultrasónicos de baja frecuencia con frecuencia y potencia ajustables.

En comparación con el agua, el gel mejora en gran medida la transmisión de ultrasonidos por los transductores y también mantiene las microalgas inmóviles durante dicha transmisión.

45 La frecuencia y potencia particulares transmitidas impiden el desarrollo del cloroplasto durante el crecimiento inicial y le permiten mantener el mismo grosor incluso durante el crecimiento, como se muestra en la Figura 3.

Se ha comprobado que la invención cumple los objetos previstos.

La invención así concebida es susceptible de cambios y variantes dentro del concepto inventivo.

Además, todos los detalles pueden ser reemplazados por otros elementos técnicos equivalentes.

En su implementación práctica se puede utilizar cualquier material y cantidad en función de las necesidades, sin apartarse del alcance tal como se define en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para el cultivo de las microalgas del género *Chlorella Vulgaris* sin modificación genética que comprende:
 - cultivar una masa de dichas microalgas en un fotobiorreactor;
- 5 caracterizado por que dicho cultivo comprende:
 - exponer dichas microalgas a condiciones de estrés mediante técnica ultrasónica, para obtener microalgas estresadas, comprendiendo dichas condiciones de estrés:
 - sumergir dichas microalgas en un tanque rodeado de transductores ultrasónicos de baja frecuencia con frecuencia y potencia ajustables y que contiene un gel conductor soluble en agua despojado de nutrientes nitrogenados o despojado de fósforo, con lo que se obtiene una reducción del grosor del cloroplasto de las microalgas estresadas con respecto al grosor del cloroplasto de una *Chlorella Vulgaris*, para evitar la absorción de una cantidad excesiva de luz, y con lo que al mismo tiempo se obtiene un aumento del volumen del citoplasma de las microalgas estresadas con respecto al volumen del citoplasma de una *Chlorella Vulgaris*, para almacenar una mayor cantidad de lípidos.
- 10
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho cultivo comprende un cultivo fototrófico que emplea dióxido de carbono derivado de humos de combustión, de motor o de horno de metano y mediante una fermentación heterotrófica, y en el que dicho cultivo fototrófico consiste en cultivar dichas microalgas mediante la luz solar y agua de pozo.
- 20 3. El método según la reivindicación 2, en el que comprende hidrocarburos alifáticos ligeros procedentes de dichas microalgas.
4. El método según la reivindicación 3, en el que dichos hidrocarburos alifáticos ligeros comprenden entre dieciséis y veintiséis átomos de carbono.
5. El método según la reivindicación 2, en el que dicho cultivo heterotrófico consiste en alimentar dichas microalgas con glucosa.

DÍA	FECHA	MAÑANA / TARDE	HORA DE ADICIÓN DE LA GLUCOSA	HORA DEL RECuento CELULAR	SOLUCIÓN DE GLUCOSA [g/l]	NÚMERO DE CÉLULAS [millones de células/ml]
1	3 de mayo	TARDE				2,7
4	6 de mayo	MAÑANA				7,8
4			12.00	16.30	2	6,9
4					3	6,9
4					5	8,9
5	7 de mayo	MAÑANA				10
5				9.15	2	7,9
5					3	8,3
5					5	9,8

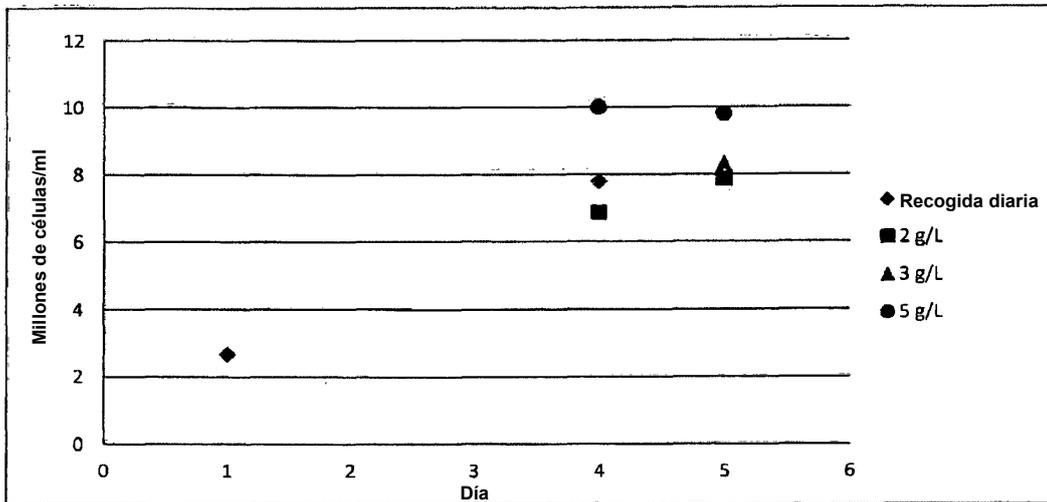


TABLA DE CRECIMIENTO CELULAR DE MICROALGAS CHLORELLA VULGARIS

FIG. 1

DÍA	FECHA	MAÑANA / TARDE	HORA DE ADICIÓN DE LA GLUCOSA	HORA DEL RECUENTO CELULAR	SOLUCIÓN DE GLUCOSA [g/l]	NÚMERO DE CÉLULAS [millones de células/ml]
1	3 de mayo	TARDE				2,7
2			12.00	16.30	2	5
3					3	10,2
4					5	20,3
5	7 de mayo	MAÑANA				41
6				9.15	2	83,3
7					3	172,3
8					5	340,2

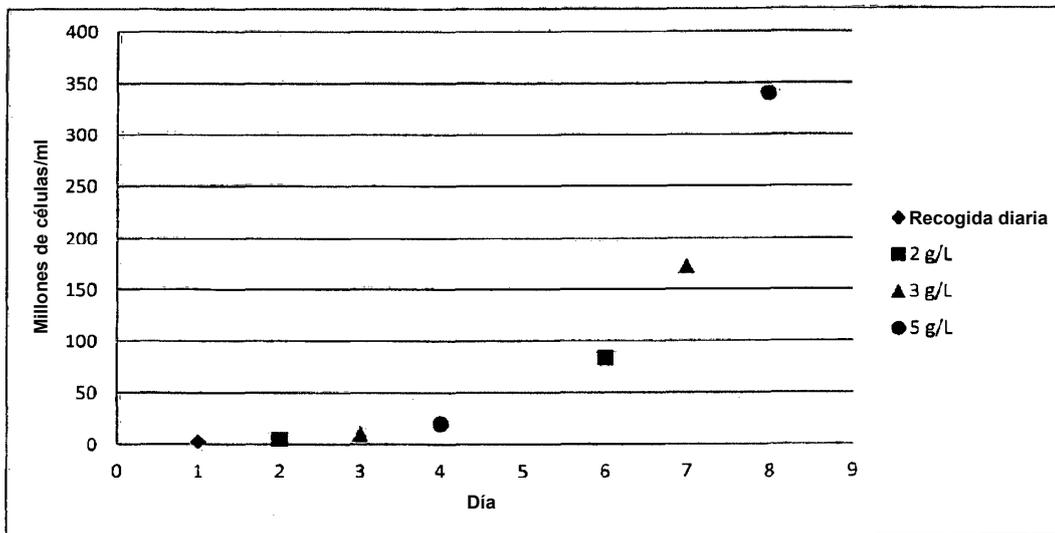


TABLA DE CRECIMIENTO CELULAR DE MICROALGAS CHLORELLA VULGARIS MOD.

FIG. 2

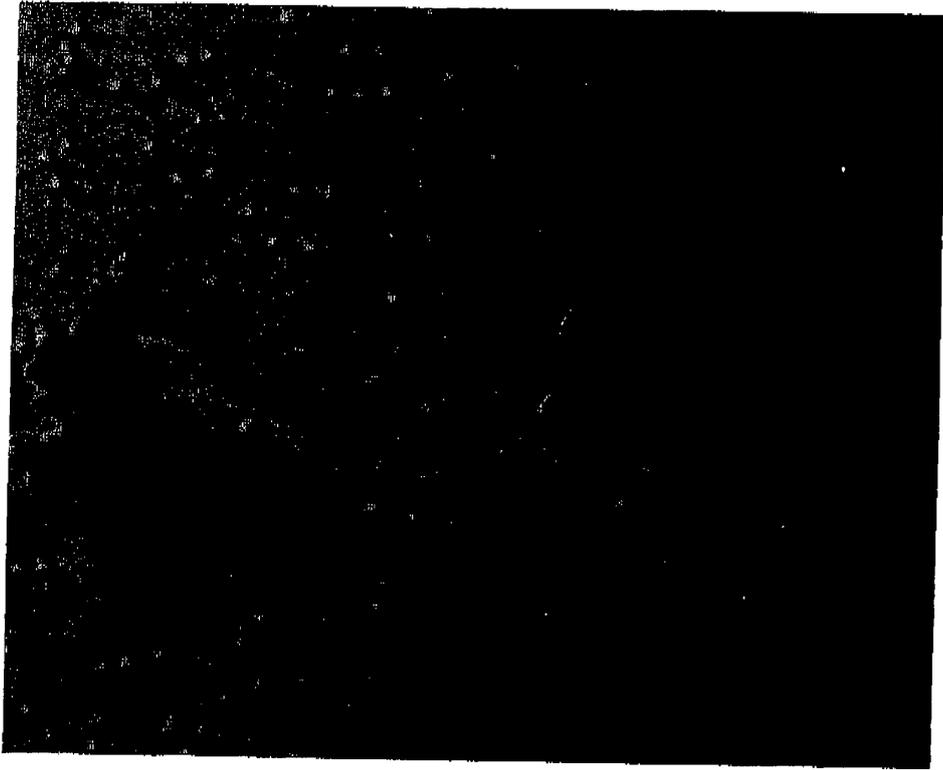


FIG. 3