

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 757 058**

51 Int. Cl.:

A23J 1/00 (2006.01)

C02F 3/32 (2006.01)

C12N 1/12 (2006.01)

C12P 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.08.2015 PCT/FR2015/052273**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2016 WO16030630**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2015 E 15763058 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 3185694**

54 Título: **Nuevo procedimiento de cultivo de algas, particularmente de microalgas**

30 Prioridad:

26.08.2014 FR 1457999

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

28.04.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CALLEJA, PIERRE y
LETERRIER, MARINA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 757 058 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

Nuevo procedimiento de cultivo de algas, particularmente de microalgas

La presente solicitud se refiere al campo del cultivo de algas, particularmente de las microalgas.

5 La invención se dirige particularmente a un procedimiento de cultivo de algas, ventajosamente de microalgas, caracterizado por que las condiciones particulares del cultivo en términos de iluminación y de nutrientes permiten obtener una biomasa constituida por microalgas que presenta al menos una cantidad baja de clorofila, ventajosamente muy baja y una cantidad de agentes antioxidantes elevada.

10 Algunas microalgas son seres mixotróficos, capaces a la vez de heterotrofia (absorción de materia orgánica en el medio de cultivo) y de autotrofia (utilización de la luz para capturar carbono a través de la fotosíntesis). A la mixotrofia se la denomina también fotoheterotrofia. El concepto de mixotrofia se extiende a la utilización de la luz no sólo para la fotosíntesis, sino también como señal luminosa que puede inducir una respuesta del metabolismo: por ejemplo, la síntesis de pigmentos.

15 La mixotrofia predominantemente heterotrófica permite producir moléculas de origen algal que unen a la vez las ventajas de la autotrofia y de la heterotrofia. Consiste en introducir un componente luminoso de baja intensidad y de corta duración. Al igual que en la heterotrofia, el sustrato orgánico alimenta las microalgas para producir grandes cantidades de biomasa, pero esta vez son activados los cloroplastos y otros orgánulos captoreadores de energía luminosa de la célula.

20 Estos captoreadores de energía luminosa o fotorreceptores están presentes en orgánulos como el estigma, que se considera como un ojo primitivo que permite a las células flageladas que lo tienen, desplazarse en función de la cantidad y de la calidad de la luz. Los otros orgánulos fotosensibles son los cloroplastos, cronoplastos o cromoplastos.

Estos fotorreceptores permiten aumentar la productividad de la célula así como permitir la síntesis de todas las moléculas que puedan ser metabolizadas por una microalga. Las moléculas de interés producidas por las microalgas son de gran interés industrial, particularmente en los campos de la nutrición, de la cosmética, de la química verde y de la energía.

25 Estas moléculas son variadas tales como, por ejemplo, los carbohidratos, las proteínas, los aminoácidos, ventajosamente los aminoácidos esenciales y los pigmentos, particularmente los pigmentos fotosintéticos, de los cuales los principales son las clorofilas y los carotenoides.

30 Existen varias especies de clorofilas (clorofilas a, b, c, d y f), que difieren entre ellas por los detalles de su estructura molecular y, por otra parte, por sus propiedades específicas de absorción. La clorofila "a" es el pigmento fotosintético más común del reino vegetal; se encuentra en todas las plantas terrestres y acuáticas. Sus picos de absorción de la luz se encuentran a 430 nm y a 660 nm. La clorofila "b" se encuentra en las microalgas pero en menor cantidad. Sus picos de absorción están centrados a 450 nm y 645 nm.

35 Según los parámetros de iluminación que se aplican durante un cultivo de microalgas, es posible encauzar la producción de metabolitos y, en particular, de pigmentos. La combinación de una luz discontinua en forma de flashes y de un espectro luminoso particular se puede obtener mediante el empleo de LED (Light Emitting Diodes). Las longitudes de onda se pueden seleccionar para que coincidan o se aproximen al pico de absorción de los carotenoides o de las clorofilas. La inducción de la acumulación de un pigmento en particular se puede obtener limitando al mismo tiempo la acumulación de los otros pigmentos presentes en la célula.

40 El término carotenoide reúne los carotenos (α , β , ϵ , γ , δ o ζ -caroteno, licopeno y fitoeno) y las xantofilas (astaxantina, anteraxantina, citranaxantina, criptoxantina, cantaxantina, diadinoxantina, diatoxantina, flavoxantina, fucoxantina, luteína, neoxantina, rodoxantina, rubixantina, sifonaxantina, violaxantina, zeaxantina). Los carotenoides son pigmentos más bien anaranjados y amarillos, liposolubles. Son sintetizados por todas las algas, todas las plantas verdes y por muchos hongos y bacterias (incluidas las cianobacterias). Son absorbidos por los animales y los seres humanos en su alimentos. Los carotenoides tienen dos picos de absorción principales situados alrededor de 440 y 475 nm.

45 En las plantas, los carotenoides son pigmentos accesorios de la fotosíntesis, que tienen dos papeles principales: un papel de colector de luz (transferencia a la clorofila de la energía luminosa que ellos absorben en los intervalos del espectro situados entre el violeta y el rojo) y un papel fotoprotector (recuperación de la energía de la clorofila, particularmente en caso de exceso de luz y de sombra) cuya presencia permite a la clorofila evitar las degradaciones debidas a la fotooxidación.

50 Los carotenoides desempeñan un papel importante en la nutrición y la salud, puesto que muchos son provitaminas A, y algunos presentan también actividades anticáncer y antioxidantes. Estimulan además la síntesis de anticuerpos. Algunos de ellos son ampliamente utilizados en la industria agroalimentaria por sus propiedades colorantes, y también en las industrias cosmética y farmacéutica por sus propiedades antioxidantes y su capacidad de fotoprotección.

Ciertos carotenoides son de gran interés, como la luteína y la astaxantina, esta última particularmente por su importante poder antioxidante.

5 Las microalgas son interesantes como fuente adicional de alimentos, ya que pueden ser fuente de proteínas, de fibras, de lípidos o incluso de agentes antioxidantes, particularmente los carotenoides. Se pueden utilizar nativas, ventajosamente secas, pero también transformadas, por ejemplo reducidas a la forma de harinas.

Se pueden utilizar en la alimentación humana o animal, como suplemento nutricional o incorporadas en pequeña cantidad en los alimentos, donde pueden reemplazar a los huevos y las materias grasas, por ejemplo, para la fabricación de pan.

10 Las harinas de microalgas obtenidas a partir de algas cuyo cultivo ha sido realizado en tanques abiertos o en fotobiorreactores están disponibles comercialmente.

Existe una cepa de microalgas del género *Chlorella* (*Chlorella protothecoides*) que entra en la composición de muchos alimentos, porque esta cepa tiene la particularidad de destruir su clorofila en condiciones heterotróficas, es decir, cuando el medio contiene una fuente de carbono. También existen cepas mutantes deficientes en pigmentos (documento US2013/0122181).

15 El documento KR 2011 0072830 describe un procedimiento autotrófico de cultivo de *Chlorella* que utiliza el CO₂ como fuente de carbono, siendo uno de sus objetivos eliminar el CO₂ causa del calentamiento climático. El documento WO 2013/063075 indica que una disminución de la intensidad de la iluminación entre 400 y 450 nm conduce a una estimulación de la acumulación de clorofila.

20 Así, aparte de ciertos mutantes y ciertas cepas salvajes de algas tales como las descritas anteriormente, la gran mayoría de las microalgas verdes presentan un nivel de clorofila importante, lo que las hace poco apreciadas debido a su sabor y también por la falta de apetencia del color verde. Por lo tanto, su utilización, como se ha descrito anteriormente, es o bien limitada o bien compleja si se quiere reducir la cantidad de clorofila en la biomasa empleada en la utilización deseada.

25 Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de una biomasa de microalgas pobre en clorofila pero rica en sus otros metabolitos de interés que podría derivarse del cultivo de cepas de microalgas comunes y comúnmente utilizada en cultivo.

30 Sería por lo tanto interesante disponer de un procedimiento de cultivo de microalgas "salvajes" (es decir, que presentan normalmente en condiciones de cultivo estándar un nivel importante de clorofila), procedimiento que permitiría obtener una biomasa de dichas microalgas pobre en clorofila pero rica en sus otros metabolitos de interés. Tal procedimiento debería permitir reducir las cantidades de pigmentos de clorofila durante el cultivo de las microalgas salvajes, que normalmente presentan en cultivo estándar un nivel importante de clorofila.

35 La presente invención tiene como objetivo proporcionar tal procedimiento de cultivo de microalgas, que podría permitir orientar mejor la distribución de los pigmentos en las microalgas producidas, con el fin de obtener microalgas empobrecidas en clorofila, pero que mantienen naturalmente un nivel alto de agentes antioxidantes, ventajosamente de carotenoides.

40 Una biomasa de este tipo podría ser utilizada después como es sabido, bien en su forma nativa, eventualmente seca, o bien en forma de un derivado como, por ejemplo, en la forma de harinas, en todos los campos de utilización conocidos de las microalgas. o de sus derivados (harinas u otros), particularmente en nutrición, una vez que se han empobrecido en clorofila, presentando entonces dicha biomasa o sus derivados un sabor y un color verde disminuidos o incluso inexistentes, haciendo de este modo que los productos que los contienen sean más sabrosos.

45 Los inventores han demostrado, de manera sorprendente y después de largas investigaciones, que un cultivo de microalgas en un medio que comprende al menos una fuente de carbono, y que comprende al menos una etapa de iluminación mediante una radiación que tiene un espectro estrecho de longitud de onda comprendida entre 450 nm y 500 nm puede permitir obtener una biomasa pobre en clorofila y rica en agentes antioxidantes, particularmente en carotenoides. En efecto, los inventores han demostrado que una iluminación por una radiación que tiene un espectro estrecho centrado en la longitud de onda de 475 nm será absorbida por los pigmentos carotenoides, pero muy poco por la clorofila.

50 El procedimiento de cultivo realizado con una iluminación de este tipo y con un medio de cultivo que comprende una fuente carbonada permite la obtención de una biomasa con un contenido en clorofila inferior a 500 ppm, o incluso de menos de 100 ppm, preferiblemente de 20 o menos de 20 ppm, aún más preferiblemente menos de 2 ppm, particularmente en ciertas cepas de microalgas, manteniendo a la vez una producción de carotenoides normal o incluso mejorada, es decir, una cantidad de carotenoides comprendida entre 50 y 10000 ppm, 1000 y 7500 ppm, preferiblemente entre 2000 y 5000 ppm. .

Las microalgas, particularmente ciertas cepas, producen naturalmente luteína y en menor cantidad astaxantina. Es posible favorecer la producción de astaxantina con respecto a la luteína aportando una fuerte intensidad luminosa y/o utilizando un medio con carencia de nitrógeno (Cordera et al., Mar. Drugs 2012, 10, 2069-2088).

5 Ventajosamente, la producción de astaxantina se puede mejorar con respecto a la producción de luteína aportando una fuerte intensidad luminosa y utilizando un medio deficiente en nitrógeno.

El procedimiento según la invención permite aumentar el contenido de astaxantina en la biomasa obtenida de forma industrial. Además, la fuerte intensidad luminosa se puede limitar a la longitud de onda elegida (475 nm) a fin de limitar la producción de clorofila.

10 Por estrecho se entiende según la invención que el espectro de luz utilizado esté centrado sobre una longitud de onda dada y que no se extienda a cada lado de dicha longitud de onda en más de 25 nm.

15 Por lo tanto, la invención tiene como primer objetivo, un procedimiento de cultivo de microalgas en un medio de cultivo que comprende al menos una fuente de carbono, y que comprende al menos una etapa de iluminación por una radiación que presenta un espectro estrecho de longitud de onda comprendida entre 450 nm y 500 nm. Preferiblemente según la invención, la longitud de onda elegida estará comprendida entre 460 y 490 nm, muy preferiblemente centrada a 475 nm.

20 La iluminación del cultivo de microalgas por una luz de longitud de onda centrada a 475 nm y cuyo espectro no se extienda más allá de 25 nm de cada lado, permite evitar la acumulación de clorofila por las microalgas sin otra influencia importante sobre el desarrollo de las microalgas en cultivo, particularmente sobre la acumulación de los otros metabolitos de interés contenidos en dichas microalgas, particularmente los agentes antioxidantes, muy particularmente los carotenoides.

De lo anterior se comprende que la invención consiste en una variante de cualquier procedimiento de cultivo de microalgas conocido, variante que permite, sobre la base de un procedimiento de cultivo conocido, obtener una biomasa particular. Por lo tanto, esta variante (condiciones particulares de iluminación) se puede incluir en cualquier procedimiento de cultivo de microalgas conocido de la técnica anterior.

25 Así, según la invención, las condiciones de cultivo de las cepas de algas podrán ser las condiciones conocidas y utilizadas para cultivar las cepas de microalgas utilizadas. Ventajosamente, se utilizarán las condiciones que permitan el mejor rendimiento de biomasa. Los expertos en la técnica sabrán integrar la etapa de iluminación según la invención en un procedimiento conocido, con el fin de obtener una biomasa lo más importante posible, que responda a los criterios según la invención en nivel de clorofila y en nivel de carotenoides.

30 A este respecto, se pueden citar los procedimientos descritos por Cordero et al. (Marine Drugs, 2011, 9: 1607-1624) y Bumbak et al. (Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 91: 31-46).

Pueden ser preferidos los procedimientos que permitan un rendimiento en biomasa importante. Como ejemplo de procedimiento se puede citar el descrito, por ejemplo, por Doucha et Livansky (J Appl Phycol, 2012, 24 (1): 35-43).

35 Más particularmente, esta etapa podrá ser integrada en los procedimientos descritos por el solicitante en las solicitudes Nos. WO2013/136027 y WO2012/035262.

Según la invención, la iluminación puede ser producida por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica, especialmente una o varias lámparas, uno o varios tubos, uno o varios diodos electroluminiscentes (los LED).

Los inventores han demostrado que el procedimiento es aún más eficaz cuando la iluminación se realiza por uno o varios diodos electroluminiscentes (LED).

40 Por lo tanto, según una variante de la invención, la iluminación se puede realizar por uno o varios LED. Los LED son preferiblemente los LED comerciales.

A modo de ejemplo se citan los LED procedentes de la casa Seoul Optodevice Co., LTD (Corea del Sur), de la casa Nichia Corporation (Japón) o incluso de la casa SunLED Corporation (Estados Unidos).

45 Según el procedimiento de la invención, dicho medio de cultivo puede ser sometido a radiación luminosa durante un tiempo suficiente que corresponde al menos al tiempo necesario para que se cumplan los criterios de nivel de clorofila y nivel de carotenoides deseados; por supuesto, este tiempo dependerá del procedimiento de cultivo en el que esta etapa de iluminación esté incluida. Los expertos en la técnica sabrán determinar sin excesiva experimentación este tiempo necesario. Sabrán adaptar este tiempo gracias a sus conocimiento del campo.

50 Más particularmente, las condiciones de mixotrofia se pueden obtener en condiciones de iluminación discontinua y/o variable a lo largo del tiempo.

Por iluminación discontinua, se debe entender una iluminación marcada por períodos de oscuridad. La iluminación puede ser especialmente en forma de flashes. Un flash, en el sentido de la invención, es una iluminación de una duración dada.

5 Según la invención, con respecto a la iluminación, se deben considerar 3 conceptos: la frecuencia o el número de flashes por unidad de tiempo, la duración del flash y la intensidad de la luz emitida.

En términos de frecuencia según la invención, se definen, según el número de flashes por unidad de tiempo utilizado en el procedimiento según la invención, dos tipos de iluminación:

10 - Una iluminación de baja frecuencia cuyo número de flashes puede estar comprendido entre aproximadamente 2 y $3,6 \cdot 10^4$ por hora ($5,4 \cdot 10^{-4}$ Hz a 10 Hz), preferiblemente entre 3 y $3,6 \cdot 10^3$ por hora ($8,3 \cdot 10^{-4}$ Hz a 1 Hz). Bien entendido aquí que el número de flashes por hora puede tomar todos los valores comprendidos entre 2 y 36000 sin que sea necesario citarlos todos (2, 3, 4, ..., 35598, 35599, 36000).

15 - Una iluminación de alta frecuencia cuyo número de flashes puede estar comprendido entre aproximadamente $3,6 \times 10^4$ y $5,4 \times 10^9$ (10 Hz a $1,5 \cdot 10^6$ Hz) por hora, preferiblemente entre $3,6 \times 10^5$ y $5,4 \times 10^9$ (100 Hz a $1,5 \cdot 10^6$ Hz). Bien entendido aquí que el número de flashes por hora puede tomar todos los valores comprendidos entre $3,6 \times 10^5$ y $5,4 \times 10^9$ sin que sea necesario citarlos todos (36000, 36001, 36002, ..., 5399999998, 5399999999, 5400000000).

En términos de duración según la invención, cualquiera que sea la frecuencia de iluminación elegida, la duración del flash puede estar comprendida entre 1/150000 de segundo y 1799 segundos (29 minutos y 59 segundos).

20 Evidentemente, cuando se utiliza una iluminación de alta frecuencia, la duración del flash podrá estar comprendida preferiblemente entre 1/150000 de segundo y 1/10 de segundo. Y cuando se utiliza una iluminación de baja frecuencia, la duración del flash podrá estar preferiblemente comprendida entre 1/10 de segundo y 1799 de segundo (29 minutos y 59 segundos).

25 En términos de intensidad luminosa según la invención, la intensidad de la luz aportada en forma de flashes puede estar comprendida entre 5 y 5000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, preferiblemente entre 5 y 2000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, o 50 y 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, y más preferiblemente entre 150 y 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (1 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ corresponde a 1 $\mu\text{E m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Einstein), unidad utilizada frecuentemente en la literatura).

Según la invención, el número de flashes por hora se puede elegir en función de la intensidad y de la duración de los flashes (véase lo anterior).

30 Según la invención, los conceptos de frecuencia, de duración y de intensidad luminosa se aplican a la iluminación según lo previsto en la invención, es decir a la iluminación producida por la fuente luminosa seleccionada, ventajosamente por un LED, que emite una radiación luminosa de espectro estrecho comprendido entre 450 y 500 nm, preferiblemente centrado a 475 nm y durante los tiempos considerados según la invención.

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

Por iluminación variable se entiende que la intensidad de la luz varía de manera regular al menos dos veces por hora. Un ejemplo de las condiciones de iluminación adaptadas al procedimiento de la invención está descrito en la solicitud internacional del mismo solicitante publicada el 22 de marzo de 2012 con el número WO2012035262.

40 La iluminación puede presentar, preferiblemente, variaciones de intensidad cuya amplitud está generalmente comprendida entre 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y 2000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, preferiblemente entre 50 y 1500, más preferiblemente entre 50 y 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Según un modo de realización preferido, la iluminación presenta variaciones de intensidad cuya amplitud está comprendida entre 5 y 1000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, preferiblemente entre 5 y 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, teniendo lugar estas variaciones entre 2 y 3600, preferiblemente entre 2 y 200 veces por hora.

45 Estas condiciones de cultivo permiten aportar una cantidad definida de luz. Este aporte luminoso puede comprender fases de iluminación discontinua y/o variable, con variaciones de intensidad que pueden tener amplitudes idénticas o diferentes.

50 Ventajosamente según la invención, el procedimiento puede comprender, simultánea o independientemente, cualquier otra etapa necesaria para el crecimiento de la biomasa, como por ejemplo y sin ser limitativo, una o varias etapas de cultivo sin luz o incluso una o varias etapas de recuperación de la biomasa.

El procedimiento según la invención se derivará evidentemente del procedimiento elegido por los expertos en la técnica para cultivar la cepa de algas seleccionada, al cual añadirán una (o varias) etapas de iluminación del cultivo. Las

condiciones de cultivo dependerán por lo tanto, del procedimiento elegido. En particular, la temperatura de cultivo dependerá de la cepa elegida.

De una manera general, el cultivo según el procedimiento se podrá llevar a cabo a una temperatura comprendida entre 15 °C y 38 °C, ventajosamente entre 22 °C y 32 °C.

- 5 Según la invención, las microalgas cultivadas según el procedimiento de la invención se pueden elegir de todas las cepas de interés, particularmente entre las clases de las Chlorophyceae y de las Trebouxiophyceae, que son dos clases de algas verdes muy cercanas filogenéticamente (Lewis and McCourt, 2004 Am. J. Bot., 91 (10): 1535-1556). La clasificación de las microalgas, originalmente basada en características morfológicas y bioquímicas, ha sido modificada varias veces para integrar los datos genéticos a medida que estaban disponibles. Parece que ciertos
- 10 géneros como Chlorella y Chlamydomonas son polifiléticos, es decir que se encuentran en varias clases. Por ejemplo, se encuentran miembros del género chlorella en las clases de las Chlorophyceae y de las Trebouxiophyceae. Entre la clase de las Chlorophyceae, las cepas seleccionadas pertenecerán ventajosamente a los géneros Scenedesmus, Desmodesmus, Monoraphidium y Chlorella. Entre la clase de las Trebouxiophyceae, las cepas seleccionadas pertenecerán ventajosamente al género Chlorella.
- 15 Cuando las microalgas son del género Chlorella, se podrán seleccionar entre las especies *C. acuminata*, *C. anitrata*, *C. antarctica*, *C. botryoides*, *C. conductrix*, *C. conglomerata*, *C. desiccata*, *C. emersonii*, *C. fusca*, *C. gluco tropha*, *C. homosphaera*, *C. infusionum*, *C. luteoviridis*, *C. marina*, *C. miniata*, *C. minutissima*, *C. mirabilis*, *C. nocturna*, *C. oocystoides*, *C. ovalis*, *C. parasitica*, *C. parva*, *C. peruviana*, *C. protothecoides*, *C. pyrenoidosa*, *C. regularis*, *C. rugosa*, *C. saccharophila*, *C. salina*, *C. sorokiniana*, *C. spaerckii*, *C. stigmatophora*, *C. subsphaerica*, *C. variabilis*, *C. variegata*,
- 20 *C. vulgaris*, *C. xanthella*, *C. zopfingensis*.

Ventajosamente, según la invención, las algas del género Chlorella podrán ser algas seleccionadas entre las especies *C. sorokiniana*, *C. vulgaris* y *C. saccharophila*.

- Cuando las microalgas son del género Scenedesmus, podrán ser seleccionadas entre las especies *S. abundans*, *S. aciculatus*, *S. aculeolatus*, *S. aculeotatus*, *S. acuminatus*, *S. acutiformis*, *S. acutus*, *S. aldavei*, *S. ambuehlii*, *S. anhuiensis*, *S. anomalus*, *S. apicaudatus*, *S. apiculatus*, *S. arcuatus*, *S. aristatus*, *S. armatus*, *S. arvernensis*, *S. bacillaris*, *S. baculiformis*, *S. bajacalifornicus*, *S. balatonicus*, *S. basiliensis*, *S. bernardii*, *S. bicaudatus*, *S. bicellularis*, *S. bidentatus*, *S. bijuga*, *S. bijugatus*, *S. bijugus*, *S. brasiliensis*, *S. breviaculeatus*, *S. brevispina*, *S. caribeanus*, *S. carinatus*, *S. caudato-aculeolatus*, *S. caudatus*, *S. chlorelloides*, *S. circumfusus*, *S. coalitus*, *S. costatogranulatus*, *S. crassidentatus*, *S. curvatus*, *S. decorus*, *S. denticulatus*, *S. deserticola*, *S. dilecticus*, *S. dimorphus*, *S. disciformis*, *S. dispar*, *S. distentus*, *S. ecornis*, *S. ellipsoideus*, *S. ellipticus*, *S. falcatus*, *S. fenestratus*, *S. grahneisii*, *S. granulatus*, *S. gujaratisensis*, *S. hanleyi*, *S. helveticus*, *S. heteracanthus*, *S. hindakii*, *S. hirsutus*, *S. hortobagyi*, *S. huangshanensis*, *S. hystrix*, *S. incrassatulus*, *S. indianensis*, *S. indicus*, *S. intermedius*, *S. jovais*, *S. jugalis*, *S. kerguelensis*, *S. kissii*, *S. lefevrei*, *S. littoralis*, *S. longispina*, *S. longus*, *S. mirus*, *S. multistriatus*, *S. naegelii*, *S. nanus*, *S. oahuensis*, *S. obliquus*, *S. obtusus*, *S. olvalternus*, *S. opoliensis*, *S. ovalternus*, *S. pannonicis*, *S. papillosum*, *S. parisiensis*, *S. parvus*, *S. peccensis*, *S. perforatus*, *S. planctonicus*, *S. plarydiscus*, *S. platydiscus*, *S. pleiomorphus*, *S. polessicus*, *S. polyglobulus*, *S. polyspinosus*, *S. praetervisus*, *S. prismaticus*, *S. producto-capitatus*, *S. protuberans*, *S. pseudoarmatus*, *S. pyrus*, *S. quadrialatus*, *S. quadricauda*, *S. quadrispina*, *S. raciborskii*, *S. reginae*, *S. reniformis*, *S. rostrato-spinosus*, *S. rotundus*, *S. schneppii*, *S. securiformis*, *S. semipulcher*, *S. senilis*, *S. serrato-perforatus*, *S. serratus*, *S. serrulatus*, *S. setiferus*, *S. smithii*, *S. soli*, *S. sooi*, *S. spinosus*, *S. spinulatus*, *S. striatus*, *S. subspicatus*,
- 35 *S. tetrademiiformis*, *S. tricostatus*, *S. tschudyi*, *S. vacuolatus*, *S. velitaris*, *S. verrucosus*, *S. vesiculosus*, *S. weberi*, *S. wisconsinensis*, *S. wuhanensis*, *S. wuhuensis*.

Ventajosamente según la invención, las algas del género Scenedesmus pueden ser algas seleccionadas entre las especies *S. abundans*, *S. armatus* y *S. obliquus*.

- Cuando las microalgas son del género Desmodesmus, se podrán seleccionar entre las especies *D. abundans* (en todas sus variantes), *D. aculeolatus*, *D. ambuehlii*, *D. armatus* (en todas sus variantes), *D. arthrodesmiiformis*, *D. asymmetricus*, *D. baconii*, *D. bicaudatus*, *D. bicellularis*, *D. brasiliensis* (en todas sus variantes), *D. caudato-aculeatus* (en todas sus variantes), *D. communis* (en todas sus variantes), *D. costatogranulatus* (en todas sus variantes), *D. cuneatus*, *D. curvatocornis*, *D. denticulatus* (en todas sus variantes), *D. dispar*, *D. echinulatus*, *D. elegans*, *D. eupectinatus*, *D. fennicus*, *D. flavescens* (en todas sus variantes), *D. gracilis*, *D. grahneisii*, *D. granulatus*, *D. hystericoides*, *D. hystrix*, *D. insignis*, *D. intermedius* (en todas sus variantes), *D. itascaensis*, *D. kissii*, *D. komarekii* (en todas sus variantes), *D. lefevrei* (en todas sus variantes), *D. lunatus*, *D. magnus*, *D. maximus* (en todas sus variantes), *D. microspina*, *D. multicauda*, *D. multiformis*, *D. multivariabilis* (en todas sus variantes), *D. opoliensis* (en todas sus variantes), *D. pannonicus*, *D. perdix*, *D. perforates* (en todas sus variantes), *D. perforatus*, *D. pirkollei*, *D. pleiomorphus*, *D. polyspinosus*, *D. protuberans*, *D. pseudodenticulatus*, *D. pseudohystrix*, *D. pseudoserratus*, *D. quadricaudatus*, *D. regularis*, *D. santosii*, *D. schneppii*, *D. serratoides*, *D. serrato-pectinatus*, *D. serratus*, *D. sp. CL1*, *D. sp. Hegewal* *D. 1987-51*, *D. sp. Itas2/24S-1d*, *D. sp. Itas6/3T-2d*, *D. sp. Itas6/3T-2W*, *D. sp. Itas8/18S-6d*, *D. sp. Mary6/3T-2d*, *D. sp. NDem6/3P-3d*, *D. sp. NDem9/21T-10W*, *D. sp. Tow10/11T-12W*, *D. sp. Tow10/11T-17W*, *D. sp. Tow10/11T-1W*, *D. sp. Tow10/11T-2W*, *D. sp. Tow10/11T-3W*, *D. sp. Tow10/11T-6W*, *D. sp. Tow10/11T-8W*, *D. sp. Tow6/16T-10W*, *D. sp. Tow6/16T-15W*, *D. sp. Tow6/16T-16W*, *D. sp. Tow6/16T-17W*, *D. sp. Tow6/16T-26W*, *D. sp. Tow6/16T-31W*, *D. sp. Tow6/16T-32W*, *D. sp. Tow6/16T-35W*, *D. sp. Tow6/16T-8W*, *D. sp. Tow6/16T-9W*, *D. sp. Tow6/3T-11d*, *D. sp.*

Tow8/18P-13W, D. sp. Tow8/18P-14W, D. sp. Tow8/18P-1d, D. sp. Tow8/18P-25W, D. sp. Tow8/18P-3W, D. sp. Tow8/18P-4W, D. sp. Tow8/18T-10W, D. sp. Tow8/18T-23W, D. sp. Tow8/18T-25W, D. sp. Tow8/18T-5W, D. sp. WTwin8/18P-2d, D. spinosus, D. spinulatus, D. subspicatus (en todas sus variantes), *D. tropicus* (en todas sus variantes), *D. ultrasquamatus*.

- 5 Ventajosamente según la invención, las algas del género *Desmodesmus* pueden ser algas seleccionadas entre las especies *D. istacaensis, D. intermedius* y *D. costado-granulatus*.

10 Cuando las microalgas son del género *Monoraphidium*, podrán ser seleccionadas entre las especies *M. braunii, M. circinale, M. contortum, M. convolutum, M. dybowskii* (en todas sus variantes), *M. griffithii, M. minutum, M. neglectum, M. pusillum, M. saxatile, M. terrestre, M. sp. AKS-5, M. sp. Dek19, M. sp. FXY-10, M. sp. GK12, M. sp. IKA11, M. Itas* (en todas sus variantes), *M. sp. KMMCC* (en todas sus variantes), *M. sp. LUCC004, M. sp. No. 5F4, M. sp. NTA103, M. sp. PTP1, M. sp. PTP4, M. sp. SS*.

Ventajosamente, según la invención, las algas del género *Monoraphidium* pueden ser algas seleccionadas entre las especies *M. minutum, M. circinale* y *M. sp. GK12*.

- 15 Según la invención, el procedimiento de cultivo puede ser utilizado para cultivar una sola cepa de microalgas de un género dado, varias cepas de un solo género dado o varias cepas de diferentes géneros dados (al menos 2 especies de 2 géneros diferentes) .

20 Según la invención, la fuente carbonada se puede seleccionar entre cualquier fuente carbonada conocida y utilizable según la cepa elegida. Los expertos en la técnica podrán seleccionar sin dificultad la fuente carbonada que mejor se adapte a la cepa a cultivar. A modo de ejemplo, se pueden citar, como fuente carbonada utilizable, la glucosa, los derivados de celulosa, del lactato, del almidón, de lactosa, de sacarosa, del acetato o incluso del glicerol.

El sustrato carbonado orgánico contenido en el medio de cultivo puede consistir en moléculas complejas o una mezcla de sustratos. Los productos resultantes de la biotransformación del almidón, por ejemplo a partir de maíz, de trigo o de patata, especialmente los hidrolizados del almidón, que están constituidos por moléculas pequeñas, constituyen, por ejemplo, sustratos carbonados orgánicos adaptados al cultivo en mixotrofia de las células según la invención.

- 25 Las cantidades de fuentes carbonadas utilizadas según el procedimiento dependerán, por supuesto, de la cepa elegida. Los expertos en la técnica podrán también adaptar sin dificultad las cantidades de fuente carbonada a la cepa a cultivar en forma pura o en mezcla.

Según un modo de realización de la invención, el sustrato carbonado orgánico puede tener una concentración comprendida entre 5 mM y 1,5 M, preferiblemente entre 50 mM y 800 mM.

- 30 El cultivo se puede realizar mediante cualquier técnica de cultivo conocida, por ejemplo en matraces o en un reactor, pero también en fermentadores o incluso en cualquier recipiente adecuado para el crecimiento de microalgas, como por ejemplo los tanques tipo "de corriente", siempre que dicha técnica permita poner en contacto las microalgas con al menos la fuente carbonada, y que además esté equipado con al menos una fuente de luz que emita en las longitudes de onda que presentan un espectro estrecho comprendido entre 450 nm y 500 nm, preferiblemente comprendido entre 35 460 y 490 nm, muy preferiblemente centrado a 475 nm, cuya acción sobre el cultivo podrá conducir a la biomasa deseada, es decir, una biomasa empobrecida en clorofila y rica en agentes antioxidantes, particularmente rica en carotenoides (carotenos y xantofilas, particularmente luteína y/o astaxantina).

40 El procedimiento según la invención puede comprender además una etapa de recuperación de las microalgas. Dicha recuperación de las microalgas se puede realizar por cualquier técnica que permita la recuperación de la biomasa, especialmente los métodos de filtración, gravimétricos o a presión reducida, de decantación o incluso los métodos de precipitación seguidos de una filtración gravimétrica.

Según una variante de la invención, se podrá someter además el cultivo de microalgas a una carencia de nitrógeno y/o (simultánea o independientemente) a una fuerte intensidad luminosa.

- 45 Por carencia de nitrógeno se entiende según la invención una concentración de nitrógeno (en cualquier forma conocida) en el medio de cultivo que podrá estar comprendida entre 0 y 0,5 mM, preferiblemente entre 0 y 100 µM.

Los inventores han demostrado, en efecto, que el cultivo de microalgas cuando al menos se reúne la combinación de los siguientes factores:

- presencia de una fuente de carbono;
 - sometimiento durante un tiempo suficiente al menos a una luminosidad que presente un espectro estrecho de longitud de onda comprendida entre 450 nm y 500 nm;
 - concentración reducida de nitrógeno
- 50

- fuerte intensidad luminosa

conduce a la producción de una biomasa no solamente pobre en clorofila y que comprende una cantidad de agentes antioxidantes, particularmente carotenoides, al menos normal o incluso mejorada, sino también cuya producción de astaxantina se ve favorecida en comparación con la producción de luteína.

5 La astaxantina tiene un poder oxidante muy superior a la luteína, estimula el sistema inmunitario y presenta efectos antiinflamatorios. Por lo tanto, puede ser muy interesante aumentar la cantidad de astaxantina, incluso si esto supone una disminución en la cantidad de luteína.

10 Más precisamente según esta variante, la biomasa así producida tiene un nivel de luteína comprendido entre 10 y 1500 ppm, ventajosamente entre 100 y 500 ppm y un nivel de astaxantina comprendido entre 10 y 1000 ppm, ventajosamente entre 200 y 500 ppm.

La invención se refiere también a la biomasa que se puede obtener por cualquiera de las variantes del procedimiento según la invención.

15 Las microalgas tienen un potencial de utilización importante en muchos campos, de los cuales se citará por ejemplo la producción de biocombustible, la descontaminación, en particular de las aguas residuales, la alimentación humana o animal, la cosmética, la medicina.

La biomasa que se puede obtener según el procedimiento de la invención se puede utilizar, por supuesto, en todos los campos conocidos de utilización de las microalgas, particularmente en alimentación y/o cosmética.

20 Se sabe que una biomasa de microalgas que se puede obtener según la invención puede ser utilizada después de la recogida bien directamente, eventualmente seca o bien después de transformación. En particular, las biomásas de microalgas son conocidas para ser utilizadas en forma de harinas que entran en composiciones alimentarias o en forma de complementos alimentarios.

25 La biomasa de microalgas que se puede obtener según la invención puede ser transformada en harina según cualquier procedimiento conocido por los expertos en la técnica. Por lo tanto, se puede prever, por ejemplo, que las microalgas puedan ser separadas del medio de cultivo, puedan ser lisadas y reducidas a partículas finas (diámetro medio de 10 micras) y después secadas.

La invención se refiere también a cualquier utilización de la biomasa de microalgas que se puede obtener según la invención en cualquier campo conocido de utilización de las microalgas, particularmente la producción de biocombustible, la descontaminación, particularmente de aguas residuales, la alimentación humana o animal, la cosmética, la medicina, preferiblemente la alimentación humana o animal, la cosmética.

30 La biomasa obtenida por cultivo de microalgas según el procedimiento de la invención puede permitir obtener en particular una harina empobrecida en clorofila (menos de 500 ppm, ventajosamente menos de 100 ppm, preferiblemente de 20 o menos de 20 ppm, muy ventajosamente menos de 2 ppm), rica en agentes antioxidantes, en particular en carotenoides (carotenos y xantofilas, particularmente luteína y/o astaxantina) en una cantidad comprendida entre 10 y 1000 ppm, 1000 y 7500 ppm, ventajosamente entre 2000 y 5000 ppm, entre ellos en particular luteína en una cantidad comprendida entre 1000 y 10000, ventajosamente entre 2000 y 5000, y/o astaxantina en una cantidad comprendida entre 10 y 1000 ppm, ventajosamente entre 200 y 500 ppm, satisfaciendo una necesidad particularmente en la industria alimentaria, porque son más sabrosas, tienen mejor sabor, aportan antioxidantes en cantidad importante y pueden ser utilizables en la alimentación humana o animal.

40 Se describe igualmente una harina que se puede obtener por transformación de la biomasa de microalgas que se puede obtener por el procedimiento según la invención.

Cualquiera que sea la forma de utilización del producto que se puede obtener por el procedimiento según la invención (biomasa nativa o transformada), dicho producto puede ser utilizado puro o mezclado con otros ingredientes utilizados convencionalmente, particularmente en alimentación o en cosmética.

45 La invención se refiere también a cualquier producto que pueda comprender al menos la biomasa de algas que se puede obtener según la invención.

Se describen también los productos que pueden comprender al menos la harina resultante de la transformación de la biomasa de algas que se puede obtener según la invención.

Los ejemplos que siguen ilustran la presente solicitud, pero sin limitarla.

Ejemplo 1: Producción de pigmentos de clorofila y carotenoides por las microalgas *Scenedesmus* y *Desmodesmus*

Se preparan cultivos de *Scenedesmus abundans* y *Desmodesmus pannonicus* en matraces de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo BG11 enriquecido en nitrógeno (Rippka et al., 1979). El sustrato carbonado utilizado es glucosa a 10 g/L. La temperatura de cultivo se fija a 26 °C.

Las condiciones de iluminación son las siguientes:

- 5 - Para la heterotrofia: los cultivos se mantienen en la oscuridad.
- Para la mixotrofia: los cultivos se iluminan con flashes (0,5 hertz, 1800 flashes por hora) con una intensidad de 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. El aporte de luz se obtiene mediante lámparas LED cuya longitud de onda se extiende de 450 nm a 500 nm, estando centrado el pico a 475 nm, para la mixotrofia limitada a la luz azul.

- 10 Para la mixotrofia "blanca", los LED utilizados cubren un espectro luminoso de 370 a 700 nm, con 3 picos centrados a 445, 550 nm y 630 nm.

Después de 7 días de cultivo, las células se centrifugan y después se liofilizan. Los métodos de extracción de los pigmentos son conocidos por los expertos en la técnica. La siguiente tabla presenta los resultados de 3 replicados biológicos.

Cepa	Modo trófico	Clorofila a (ppm)	Clorofila b (ppm)	Luteína (ppm)
<i>Scenedesmus abundans</i>	Heterotrofia	99 (\pm 40)	58 (\pm 29)	68 (\pm 27)
<i>Scenedesmus abundans</i>	Mixotrofia "azul" (450-500 nm)	210 (\pm 31)	304 (\pm 58)	3189 (\pm 245)
<i>Scenedesmus abundans</i>	Mixotrofia "blanca"	7705 (\pm 354)	2101 (\pm 287)	3568 (\pm 332)
<i>Desmodesmus pannonicus</i>	Heterotrofia	270 (\pm 36)	540 (\pm 134)	54 (\pm 11)
<i>Desmodesmus pannonicus</i>	Mixotrofia "azul" (450-500 nm)	235 (\pm 76)	688 (\pm 66)	1857 (\pm 163)
<i>Desmodesmus pannonicus</i>	Mixotrofia "blanca"	13886 (\pm 204)	4217 (\pm 157)	2289 (\pm 141)

- 15 El ensayo realizado aquí demuestra las ventajas del procedimiento según la invención. En efecto, se constata que el cultivo en mixotrofia "azul" permite obtener una biomasa con bajo contenido en clorofila a o b con relación a un cultivo en mixotrofia "blanca" con un nivel de luteína casi idéntico pero ampliamente mejorado en comparación con un cultivo en heterotrofia.

- 20 La mixotrofia "azul" combina las ventajas de la heterotrofia en términos de cantidad de clorofila a o b y de la mixotrofia blanca en términos de luteína.

Ejemplo 2: Comparación del efecto de la iluminación (longitud de onda y flashes) sobre la producción de pigmentos por *Chlorella protothecoïdes* UTEX B25

Composición del medio:

Extracto de levadura	4 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	500 mg/L
KH ₂ PO ₄	1 g/L
CaCl ₂	44 mg/L
Solución stock de Fe-EDTA (FeSO ₄ a 6,9 g/L y EDTA-Na ₂ a 9,3 g/L)	3 mL/L
Solución de trazas metálicas (3,09 g/L de EDTA-Na ₂ ; 0,080 g/L de CuSO ₄ · 5H ₂ O; 2,860 g/L de H ₃ BO ₃ ; 0,040 g/L de NaVO ₃ · 4H ₂ O; 1,820 g/L de MnCl ₂ ; 0,040 g/L de CoCl ₂ · 6H ₂ O; 0,220 g/L de ZnSO ₄ · 7H ₂ O; 0,017 g/L de Na ₂ SeO ₃ ; 0,030 g/L de (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O)	4 mL/L
Glucosa	30 g/L

- 25 Condiciones de cultivo:

En cada Erlenmeyer se inoculan 100 mL de medio al 1 % con un precultivo de *Chlorella protothecoïdes* de 7 días.

5 Para analizar el efecto de la luz, se iluminan de forma independiente los matraces Erlenmeyer con un sistema de LED blanca o de LED azul a 455 nm o a 475 nm. La intensidad luminosa para cada una de las condiciones es de $0 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (μE) en condición heterotrófica, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ con una frecuencia de 1 segundo de iluminación cada 10 segundos y $5000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ con una frecuencia de 1 segundo de iluminación cada 60 segundos en condiciones de mixotrofia. Las células se cultivan a una temperatura de 26°C con agitación moderada (200 rpm). El seguimiento del crecimiento celular se realiza cada 24 horas por medida de la absorbancia a 800 nm. Cuando se alcanza la fase estacionaria (7 días), se toman 50 mL de suspensión celular para efectuar el análisis de las cantidades de pigmentos, clorofila y carotenoides contenidos en la biomasa.

Intensidad luminosa y flash	Carotenoides (ppm)			Heterotrofia
	Luz blanca	Luz azul (455 nm)	Luz azul (475 nm)	
0 μE	-	-	-	58
100 $\mu\text{E}/1$ segundo cada 10 s	120	109	101	-
5000 $\mu\text{E}/1$ segundo cada 60 s	180	134	162	-

Intensidad luminosa y flash	Clorofilas (ppm)			Heterotrofia
	Luz blanca	Luz azul (455 nm)	Luz azul (475 nm)	
0 μE	-	-	-	0
100 $\mu\text{E}/1$ segundo cada 10 s	81	0	0	-
5000 $\mu\text{E}/1$ segundo cada 60 s	200	106	20	-

10 Los resultados muestran que en ausencia de luz (0 μE) hay ausencia de clorofila y presencia de carotenoides. En presencia de flash de baja intensidad (100 μE), la cantidad de carotenoides en la biomasa es más elevada que en la heterotrofia, cualesquiera que sean las longitudes de onda utilizadas. Sin embargo, se puede observar que en la luz azul (455 nm o 475 nm) no hay producción de clorofila, a diferencia de lo que se observa en la luz blanca. Los flashes de muy alta intensidad y baja frecuencia parecen tener un efecto mayor sobre la producción de carotenoides en comparación con el flash de baja intensidad y de más alta frecuencia. Cabe señalar que en presencia de luz blanca y de luz azul a 455 nm, la cantidad de clorofila aumenta de forma importante 200 y 106 ppm respectivamente, mientras que a 475 nm la cantidad de clorofila es 10 a 5 veces menos importante.

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de cultivo de microalgas seleccionadas entre los géneros *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Desmodesmus* y *Monoraphidium* en un medio de cultivo que comprende al menos una fuente de carbono seleccionada entre la glucosa, los derivados de celulosa, de lactato, de almidón, de lactosa, de sacarosa, de acetato o de glicerol para la preparación de una biomasa que tiene un contenido en clorofila inferior a 500 ppm y una cantidad de carotenoides comprendida entre 50 y 10000 ppm, caracterizado por que comprende al menos una etapa de iluminación por una radiación que presenta un espectro estrecho de longitud de onda comprendida entre 450 nm y 500 nm y centrada a 475 nm.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la radiación presenta un espectro estrecho de longitud de onda comprendida entre 460 nm y 490 nm.
3. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que la iluminación es proporcionada en forma de flashes.
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que la iluminación no es interrumpida por fases de oscuridad y por que la intensidad de la luz varía a lo largo del tiempo.
- 15 5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el cultivo se realiza a una temperatura comprendida entre 15 °C y 38 °C, ventajosamente entre 22 °C y 32 °C.
6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que además el cultivo de microalgas es sometido a una carencia de nitrógeno, estando comprendida la concentración de nitrógeno entre 0 y 0,5 mM.
- 20 7. Biomasa de microalgas seleccionadas entre los géneros *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Desmodesmus* y *Monoraphidium*, que tienen un contenido en clorofila inferior a 500 ppm y una cantidad de carotenoides comprendida entre 50 y 10000 ppm.
8. Biomasa según la reivindicación 7, caracterizada por que presenta un nivel de luteína comprendido entre 1000 y 10000 ppm.
- 25 9. Biomasa según una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, caracterizada por que presenta un nivel de astaxantina comprendido entre 10 y 1000 ppm.
10. Utilización de la biomasa tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, para la producción de biocombustible, la descontaminación, particularmente de las aguas residuales, la alimentación humana o animal, la cosmética, la medicina, preferiblemente la alimentación humana o animal, la cosmética.
- 30 11. Utilización de la biomasa tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, para la producción de una harina.
12. Producto que comprende al menos la biomasa tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.
- 35 13. Procedimiento de preparación de una harina que comprende la transformación de la biomasa de microalgas tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, por separación de las microalgas del medio de cultivo, lisis y reducción en partículas finas después de secado.