

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 786 195**

51 Int. Cl.:

C12P 21/00 (2006.01)

C12N 1/12 (2006.01)

C12N 1/38 (2006.01)

C12P 13/10 (2006.01)

C12P 13/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.02.2016 PCT/FR2016/050269**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.08.2017 WO17137668**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2016 E 16710780 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 3414335**

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

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.10.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 786 195 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de enriquecimiento en proteínas de la biomasa de microalgas

La presente invención se refiere a un procedimiento de enriquecimiento en proteínas de la biomasa de microalgas, más particularmente del género *Chlorella*, más particularmente aún de la especie *Chlorella protothecoides*.

5 Las algas, macro y micro, tienen una riqueza específica en gran parte inexplorada. Su explotación con fines alimentario, químico o bioenergético es todavía muy marginal. Sin embargo, contienen componentes de gran valor, tanto por su riqueza como por su abundancia.

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

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

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

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

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

Por otra parte, se calcula que el cultivo en condiciones heterotróficas cuesta 10 veces menos caro que en condiciones fotótrofas ya que, para los expertos en la técnica, estas condiciones heterotróficas permiten:

- 20 - la utilización de fermentadores idénticos a los utilizados para las bacterias y las levaduras y permiten el control de todos los parámetros del cultivo,
- la producción de biomasa en cantidades mucho más elevadas que las que se obtienen mediante un cultivo basado en la luz.

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

- los pigmentos (clorofila, a, b y c, β-caroteno, astaxantina, luteína, ficocianina, xantófilas, fitoeritrina, ...) cuya demanda es creciente, tanto por sus notables propiedades antioxidantes como por su aporte de colores naturales en la alimentación,
- 30 - los lípidos, con el fin de optimizar su contenido en ácidos grasos (hasta 60%, incluso 80% en peso de su materia seca), principalmente para:
 - aplicaciones de biocarburantes, pero también
 - aplicaciones en alimentación humana o animal, cuando las microalgas elegidas producen ácidos grasos poliinsaturados o PUFAs (por sus iniciales en inglés) denominados "esenciales" (es decir, aportados por la alimentación ya que no son producidos naturalmente por el hombre o los animales), o
- 35 - las proteínas, con el fin de optimizar las calidades nutritivas o, por ejemplo, favorecer el aporte de aminoácidos de interés.

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

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

La arginina puede degradarse y así servir de fuente de energía, de carbono y de nitrógeno a la célula que la asimila.

En varios animales, entre ellos los mamíferos, la arginina se descompone en ornitina y en urea. Esta última es una molécula nitrogenada que se puede eliminar (por excreción en la orina) de forma que se regule la cantidad de compuestos nitrogenados presente en las células de los organismos animales.

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

Los complementos alimentarios que contienen arginina se recomiendan para favorecer la salud del corazón, la función vascular, para prevenir “la agregación de las plaquetas” (riesgo de formación de coágulos sanguíneos) y para disminuir la presión arterial.

5 La implicación de la arginina en la cicatrización de las heridas está unida a su papel en la formación de la prolina, otro aminoácido importante para la síntesis del colágeno.

La arginina es, por último, un compuesto frecuentemente utilizado, principalmente por los deportistas, en las bebidas energizantes.

10 El ácido glutámico, por su parte, no es solo uno de los ladrillos elementales utilizados para la síntesis de las proteínas, sino también el neurotransmisor excitador más extendido en el sistema nervioso central (encéfalo + médula espinal) y es un precursor del GABA en las neuronas GABA-érgicas.

El glutamato se utiliza con el código “E620” como potenciador del sabor de los alimentos. Se añade a las preparaciones alimentarias para reforzar el sabor.

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

15 El glutamato (o sus sales) está presente a menudo en los platos preparados (sopas, salsas, patatas fritas, platos cocinados). También se usa habitualmente en la cocina asiática.

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

También se encuentra en algunas cápsulas de medicamentos, en este caso por sus funciones gustativas.

20 Por último, es el componente mayoritario de los productos auxiliares de cocina (pastillas de caldo, fondos de salsas, salsas, etc.).

De esta forma, se han trabajado mucho, para llegar a explotar las riquezas metabólicas de las microalgas, primeros procedimientos de fermentación que permiten obtener elevadas densidades celulares (acrónimo en inglés: HCD por *High Cell Density*), de forma que se obtengan rendimientos y productividades máximos en proteínas o en lípidos.

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

Este precepto se verifica, por ejemplo, para la biosíntesis de astaxantina por la *Chlorella zofingiensis*, en la que se ha mostrado que el crecimiento de la microalga está directamente correlacionado con la producción de este compuesto (Wang y Peng, 2.008, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24 (9), 1.915-1.922).

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

En efecto, rápidamente ha sido evidente para los expertos en la técnica que es necesario, por ejemplo, someter a las microalgas a un estrés nutricional que limite su crecimiento cuando se desea hacer que produzcan reservas lipídicas grandes.

35 Por lo tanto, a partir de ahora se procede a la desvinculación de crecimiento/producción en los procedimientos fermentativos y al control de la tasa de crecimiento celular.

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

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

La temperatura también puede ser un parámetro clave:

- 45
- por ejemplo, se ha informado de que la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados en algunas especies de microalgas, tal como el EPA por *Chlorella minutissima* está favorecida a una temperatura menor que la requerida para el crecimiento óptimo de dicha alga;
 - por el contrario, el rendimiento en luteína es mayor en la *Chlorella protothecoides* cultivada en heterotrofia cuando se aumenta la temperatura de producción de 24 a 35°C

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

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

5 Para optimizar esta producción de triglicéridos, el experto en la técnica debe optimizar el flujo carbonado hacia la producción de aceite, actuando sobre el medio nutritivo del medio de fermentación.

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

La relación C/N, por lo tanto, es determinante en este caso y se admite que los mejores resultados se obtienen actuando directamente sobre el contenido de nitrógeno, no siendo el contenido de glucosa limitante.

10 De forma no sorprendente, esta privación de nitrógeno afecta al crecimiento celular, lo que produce una tasa de crecimiento 30% menor que la tasa de crecimiento normal de la microalga (Xiong *et al.*, *Plant Physiology*, 2.010, 154, págs. 1.001-1.011).

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

De este modo, las células de *Chlorella* cultivadas con una relación C/N pequeña contienen 25,8% de proteínas y 25,23% de lípidos, mientras que una relación elevada permite la síntesis de 53,8% de lípidos y 10,5% de proteínas.

20 Por lo tanto, para optimizar su producción de aceite es primordial para el experto en la técnica controlar el flujo carbonado desviándolo hacia la producción de aceite, en detrimento de la producción de proteínas; el flujo carbonado se redistribuye y se acumula en sustancias de reserva lipídicas cuando las microalgas se colocan en un medio privado de nitrógeno.

Pero la *Chlorella protothecoides* también se puede elegir ventajosamente para producir proteínas.

25 Dado el análisis hecho por el experto en la técnica en cuanto a la gestión de la relación C/N para la producción de aceite (considerar una relación C/N grande), el experto en la técnica debe favorecer, por lo tanto, una relación C/N pequeña, y así:

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

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

La presente invención se refiere a un procedimiento de enriquecimiento en proteínas de la biomasa de microalgas, más particularmente de género *Chlorella*, más particularmente aún de la especie *Chlorella protothecoides*.

35 La presente invención se refiere a un procedimiento de enriquecimiento en proteínas de la biomasa de algunas microalgas, más particularmente de *Chlorella protothecoides*, proteínas cuyo contenido en arginina y glutamina es notablemente elevado.

La presente invención se refiere más particularmente a un procedimiento de producción de biomasa de microalgas enriquecidas en proteínas, caracterizado por que consiste en aumentar el aporte de amonio en una biomasa previamente privada de nitrógeno.

40 En efecto, en el marco de la invención, la Solicitante ha elegido, por el contrario, explorar una vía original proponiendo una solución alternativa a la clásicamente considerada por el experto en la técnica, incluso totalmente opuesta a la que habría elegido.

45 De este modo, la invención se refiere a un procedimiento de enriquecimiento en proteínas de una microalga cultivada en heterotrofia, microalga del género *Chlorella*, más particularmente aún *Chlorella protothecoides*, procedimiento de cultivo heterotrófico que comprende:

- una primera etapa que pretende limitar el aporte de amonio de forma que se obtenga una biomasa de microalgas que presente un contenido de proteínas inferior a 50% expresado en N.6,25, preferentemente inferior a 30%, preferentemente comprendido entre 20 y 25%;

- una segunda etapa en la que se aumenta el aporte de amonio en el medio de fermentación de forma que se obtenga un contenido de proteínas superior a 50%, preferentemente superior a 60%, más preferentemente aún superior a 65%.

5 Como se ilustrará a continuación, un modo de realización preferente del procedimiento según la invención puede consistir en realizar la regulación del pH en la primera etapa con una mezcla de NH_3/KOH , limitando así el aporte de amonio y favoreciendo de este modo la producción de un contenido de proteínas pequeño, y después utilizar una regulación del pH solo con NH_3 en la segunda etapa, con el fin de realimentar el medio de fermentación en amonio.

10 La mezcla de NH_3/KOH será tal que permita limitar el aporte de amonio. Por ejemplo, para una misma concentración de NH_3 entre la primera y la segunda etapa, la mezcla puede comprender relaciones de NH_3/KOH que son del orden de aproximadamente 1:1, como por ejemplo de aproximadamente 70-45% de NH_3 y 30-55% de KOH , preferentemente de aproximadamente 65-55% v/v de NH_3 y 35-45% de KOH , estando expresadas las cantidades en moles.

Por "aproximadamente" se entiende un intervalo de valores que comprenden + o - 10% del valor indicado, preferentemente + o - 5% de este. Por ejemplo, aproximadamente 10 significa entre 9 y 11, preferentemente entre 9,5 y 10,5.

15 En este modo de realización preferente, el aporte de NH_3 se multiplica entonces por aproximadamente 1,5 a 2, y la velocidad de consumo de nitrógeno que resulta de ello se multiplica por 5.

20 Esta segunda etapa es una etapa durante la que el aumento del aporte de amonio a una biomasa previamente privada de nitrógeno lleva consigo un sobreconsumo puntual de esta sal por esta biomasa y lleva de forma notable a aumentar el contenido de proteínas hasta un contenido superior a 50%, preferentemente superior a 60%, preferentemente superior a 65% (% expresados en N.6,25).

Se constata así que la velocidad específica de consumo de nitrógeno, que cae a un valor de menos de 0,005 g/g/h durante la fase de privación de nitrógeno aumenta a un valor de más de 0,01 g/g/h después de la finalización de la privación de nitrógeno.

25 En un modo de realización preferido, la velocidad de crecimiento se mantiene esencialmente constante. Por ejemplo, durante estas dos fases, la tasa de crecimiento se mantiene de 0,07 h⁻¹ a 0,09 h⁻¹, preferentemente aproximadamente a 0,08 h⁻¹.

Para ilustrar este concepto, la invención se refiere más precisamente a un procedimiento de cultivo heterotrófico de *Chlorella protothecoides* que comprende:

- una fase discontinua (tipo *batch*) después de la siembra del fermentador que aporta 20 g/L de glucosa,
- 30 - una fase semicontinua tipo *fed-batch* exponencial con una tasa de crecimiento fijada a 0,08 h⁻¹, iniciada cuando la glucosa aportada en modo discontinuo está totalmente consumida, durante las cuales se limita el aporte de amonio usando una regulación de pH por medio de una mezcla de NH_3 y KOH , como se ha mencionado anteriormente, con el objetivo de obtener una biomasa que presente menos de 25% de proteínas (expresado en N.6,25),
- 35 y después
- una fase semicontinua tipo *fed-batch* exponencial con una misma tasa de crecimiento fijada a 0,08 h⁻¹ en la que se finaliza la privación de amonio regulando el pH por medio de una disolución al 100% de amoniaco.

Por ejemplo, la segunda fase semicontinua tipo *fed-batch* en la que se finaliza la privación de amonio se inicia cuando se han introducido aproximadamente 2 kg de glucosa seca.

40 En el sentido de la invención, el criterio esencial es que el estrés celular provocado por la privación de nitrógeno del medio de fermentación, después de la finalización de este estrés en condiciones muy precisas, inicia un consumo de nitrógeno introducido para aumentar el contenido de proteínas de la biomasa producida.

Esta estrategia va, por lo tanto, en contra del prejuicio técnico según el cual para aumentar el contenido de proteínas de la biomasa, es necesario aumentar indefectiblemente el aporte de nitrógeno desde el principio del cultivo.

45 Por otra parte, estas condiciones operatorias se traducen en este caso no solo en un aumento de la riqueza en proteínas, sino que conducen igualmente a aumentar en ellas de forma notable el contenido de arginina y de glutamato.

Más particularmente, como se ilustrará a propósito a continuación, el cultivo heterotrófico de microalgas de la especie *Chlorella protothecoides* que comprende una etapa de cultivo con una privación de nitrógeno y después un pulso de amonio lleva a producir más de 45% de ácido glutámico y de arginina con respecto a los aminoácidos totales.

Así, la presente invención se refiere igualmente a un procedimiento de enriquecimiento del contenido de ácido glutámico y/o de arginina de una microalga cultivada en heterotrofia, preferentemente de un alga de la especie *Chlorella protothecoides*, comprendiendo el procedimiento el cultivo heterotrófico de dicha microalga que comprende una etapa que se dirige a limitar el aporte de amonio de forma que se obtenga una biomasa de microalgas pobre en proteínas, seguida por una etapa en la que se mantiene la tasa de crecimiento y se aumenta el aporte de amonio.

Estas condiciones de cultivo resultan de este modo en la preparación de una biomasa de microalgas que comprende más de 45% de ácido glutámico y de arginina con respecto a los aminoácidos totales.

La invención se comprenderá mejor por medio de los ejemplos siguientes, que pretenden ser ilustrativos y no limitativos.

10 Descripción de las figuras

La figura 1 muestra la evolución del N.6,25 en función de la glucosa consumida.

La figura 2 muestra por su parte la evolución de la velocidad específica del consumo de nitrógeno (qN) en función de la glucosa consumida.

15 La figura 3 muestra la evolución del N.6,25 en función del tiempo y la cantidad de cada aminoácido en % de peso de biomasa seca en función del tiempo.

La figura 4 muestra la evolución del N.6,25 en función del tiempo y la cantidad de ácidos grasos totales o particulares en % de peso de biomasa seca en función del tiempo.

La figura 5 muestra la evolución del N.6,25 en función del tiempo y la cantidad de azúcares totales o particulares en % de peso de biomasa seca en función del tiempo.

20 EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparación de una biomasa de *C. protothecoides* rica en proteínas con contenido elevado de ácido glutámico y arginina

La cepa utilizada es una de *Chlorella protothecoides* (cepa CCAP211/8D - *The Culture Collection of Algae and Protozoa*, Escocia, Reino Unido).

25 **Precultivo:**

- 150 mL de medio en un matraz Erlenmeyer de 500 mL;
- composición del medio: 40 g/L de glucosa + 10 g/L de extracto de levadura.

La incubación se desarrolla en las siguientes condiciones

- duración: 72 horas;
- 30 - temperatura: 28°C;
- agitación: 110 rpm (incubador Infors Multitron).

Cultivo en modo discontinuo y después en modo semicontinuo tipo fed-batch

Preparación y medio para el cultivo discontinuo inicial

- preparar y filtrar una mezcla de KOH de 400 g/L (41%)/ NH₃ al 20% v/v (59%);
- 35 - esterilizar el fermentador de 20 L a 121°C/20 minutos;
- inocular con 2 matraces Erlenmeyer de precultivo de 500 mL (DO_{600 nm} de 15);
- regulación del pH a 5,2 con la mezcla de KOH/NH₃;
- agitación a 300 rpm de partida;
- aireación: 15 L/min de aire;
- 40 - regulación de la pO₂ a 30% variando la agitación;
- temperatura: 28°C

Alimentación

ES 2 786 195 T3

- glucosa: 500 g/L
- sulfato de amonio: 25 g/L
- fosfato de sodio monobásico: 17 g/L
- fosfato de potasio monobásico: 23 g/L
- 5 - sulfato de magnesio heptahidratado: 20 g/L
- sulfato de hierro: 120 mg/L
- nitrato de calcio: 610 mg/L
- disolución de oligoelementos: 45 mL/L
- disolución de vitaminas: 3,6 mL/L

10

Disolución de oligoelementos (para 2 litros)	
Ingredientes	(g)
CuSO ₄ , 5 H ₂ O	0,22
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	28
MnSO ₄ , 1 H ₂ O	16
FeSO ₄ , 7 H ₂ O	2,2
Ácido cítrico	60
H ₂ O qsp	2

Disolución de vitaminas	
Ingredientes	(g/L)
Tiamina HCl	13,5
Biotina	0,7
Piridoxina	6,75

Realización de la fermentación

- aportar el equivalente de 20 g/L de glucosa antes de la inoculación,
- 15 - cuando la concentración de glucosa sea = 0 g/L, iniciar la alimentación de la glucosa en modo semicontinuo tipo *fed-batch*; utilizar un caudal que permita fijar la tasa de crecimiento a 0,08 h⁻¹
- regulación del pH a 5,2 con la mezcla de 41% de KOH/59% de NH₃
- cuando se hayan consumido 2 kg de glucosa por la microalga, se pasa a regular el pH solo por NH₃,
- 20 - cuando la biomasa alcanza 100 g/L en peso de materia seca y se han alimentado aproximadamente 3,5 kg de glucosa, se detiene la alimentación de glucosa.

Resultados

Se han realizado dos ensayos en estas mismas condiciones y los resultados se presentan en la tabla I y en las gráficas siguientes:

Tabla I

	Ensayo 1 F2 140519	Ensayo 2 F5 140623
	Valoración final (%) (para 3,6 kg de glucosa consumidos)	Valoración final (%) (para 3,4 kg de glucosa consumidos)
N.6,25	66,0	65,7
Aminoácidos totales	44,7	43,2
Contenido en Arg y Glu con respecto a los aminoácidos totales	46	47
Ácidos grasos totales	10,2	10,1
Azúcares totales	20,3	21,7
Coloración de la biomasa	Amarillo	Amarillo

La figura 1 muestra la evolución del N.6,25 en función de la glucosa consumida. Estos dos ensayos muestran resultados notables: la obtención de una biomasa amarilla con una tasa de N.6,25 de más de 65%.

5 La figura 2 muestra, por su parte, la evolución de la velocidad específica del consumo de nitrógeno (qN) en función de la glucosa consumida.

Se observa que la velocidad específica del consumo de nitrógeno alcanza el máximo después de la terminación de la limitación de nitrógeno (con 2 kg de glucosa consumidos) y después disminuye progresivamente. Las velocidades similares entre los 2 ensayos muestran igualmente una buena repetibilidad del protocolo.

10 Se ha realizado un análisis completo de los aminoácidos presentes en la biomasa en una muestra tomada justo antes de la terminación de la limitación y en varias muestras después del pulso.

Los resultados se muestran en la figura 3.

Se observa que justo antes de la terminación de la limitación de nitrógeno, la suma de los aminoácidos es pequeña (16,3%) y no hay ninguna predominancia entre los diferentes aminoácidos.

15 Una hora después de la terminación de la limitación de nitrógeno, se observa que el aminoácido que experimenta una subida mayor es el ácido glutámico, seguido de la arginina. La tasa de los otros aminoácidos aumenta igualmente pero de forma mucho menor.

El aumento del N.6,25 está correlacionado sobre todo, por lo tanto, con el aumento del ácido glutámico y de la arginina.

20 Como complemento a estos análisis, se ha realizado un análisis completo de los ácidos grasos presentes en la biomasa en una muestra tomada justo antes de la terminación de la limitación de nitrógeno y en varias muestras después del pulso.

Los resultados se muestran en la figura 4.

La tasa de ácidos grasos totales en la biomasa que es de 19,2% antes del pulso baja hasta 10,2%. El ácido graso mayoritario que sigue esta curva es el ácido oleico.

Por lo tanto, los ácidos grasos se acumulan en la biomasa cuando esta está privada de nitrógeno.

25 Igualmente se ha realizado un análisis completo de los azúcares presentes en la biomasa en una muestra tomada justo antes de la terminación de la limitación de nitrógeno y en varias muestras después de la terminación de la limitación de nitrógeno. Los resultados se muestran en la figura 5.

La tasa de azúcares totales en la biomasa que es de 37,5% antes de la terminación de la limitación de nitrógeno baja hasta 20% y después se estanca. El azúcar mayoritario que sigue esta curva es la glucosa.

30 Por lo tanto, los azúcares se almacenan igualmente en la biomasa cuando esta está privada de nitrógeno.

La tasa de azúcares parece estabilizarse a continuación, contrariamente a la tasa de ácidos grasos que siempre disminuye.

Se ha medido la carga en sales de la biomasa mediante una medida del residuo después de calcinación: en este caso es de 9%.

REIVINDICACIONES

- 1.- Procedimiento de enriquecimiento en proteínas de una microalga cultivada en heterotrofia, microalga del género *Chlorella*, más particularmente aún *Chlorella protothecoides*, caracterizado por que comprende:
- 5 - una primera etapa que pretende limitar el aporte de amonio de forma que se obtenga una biomasa de microalgas que presente un contenido de proteínas inferior a 50% expresado en N.6,25, preferentemente inferior a 30%, más preferentemente comprendido entre 20 y 25%;
- una segunda etapa en la que se aumenta el aporte de amonio en el medio de fermentación de forma que se obtenga un contenido de proteínas superior a 50%, preferentemente superior a 60%, preferentemente aún superior a 65%.
- 10 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la regulación de pH se realiza en la primera etapa mediante una mezcla de NH₃/KOH y se realiza en la segunda mediante NH₃ solo.
- 3.- Procedimiento según una u otra de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por que la mezcla de NH₃/KOH es de aproximadamente 70-45% de NH₃ y 30-55% de KOH, preferentemente de aproximadamente 65-55% v/v de NH₃ y 35-45% de KOH, estando las cantidades expresadas en moles.
- 15 4.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el aporte de amonio se multiplica por aproximadamente 1,5 a 2.
- 5.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que en la primera etapa la velocidad específica de consumo de nitrógeno por la microalga es inferior a 0,005 g/g/h y que en la segunda etapa es superior a 0,01 g/g/h.
- 20 6.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la tasa de crecimiento se mantiene esencialmente constante durante la primera y la segunda fase, preferentemente mantenida de 0,07 h⁻¹ a 0,09 h⁻¹, preferentemente a aproximadamente 0,08 h⁻¹.
- 7.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que comprende:
- una fase discontinua, después de la siembra del fermentador, que aporta 20 g/L de glucosa,
- 25 - una fase semicontinua tipo *fed-batch* exponencial con una tasa de crecimiento fijada a 0,08 h⁻¹, iniciada cuando la glucosa aportada en modo discontinuo se ha consumido totalmente,
- durante las cuales se limita el aporte de amonio usando una regulación del pH por medio de una mezcla de NH₃ y de KOH con el objetivo de obtener una biomasa que presente menos de 25% de proteínas (expresado en N. 6,25)
- 30 y después
- una fase semicontinua tipo *fed-batch* exponencial con la misma tasa de crecimiento fijada a 0,08 h⁻¹ durante la que se termina la limitación de amonio regulando el pH por medio de una disolución de amoniaco al 100%.
- 35 8.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que lleva a la producción de una biomasa de microalgas que presenta más de 45% de ácido glutámico y de arginina con respecto a los aminoácidos totales que componen dicha biomasa.

Figura 1

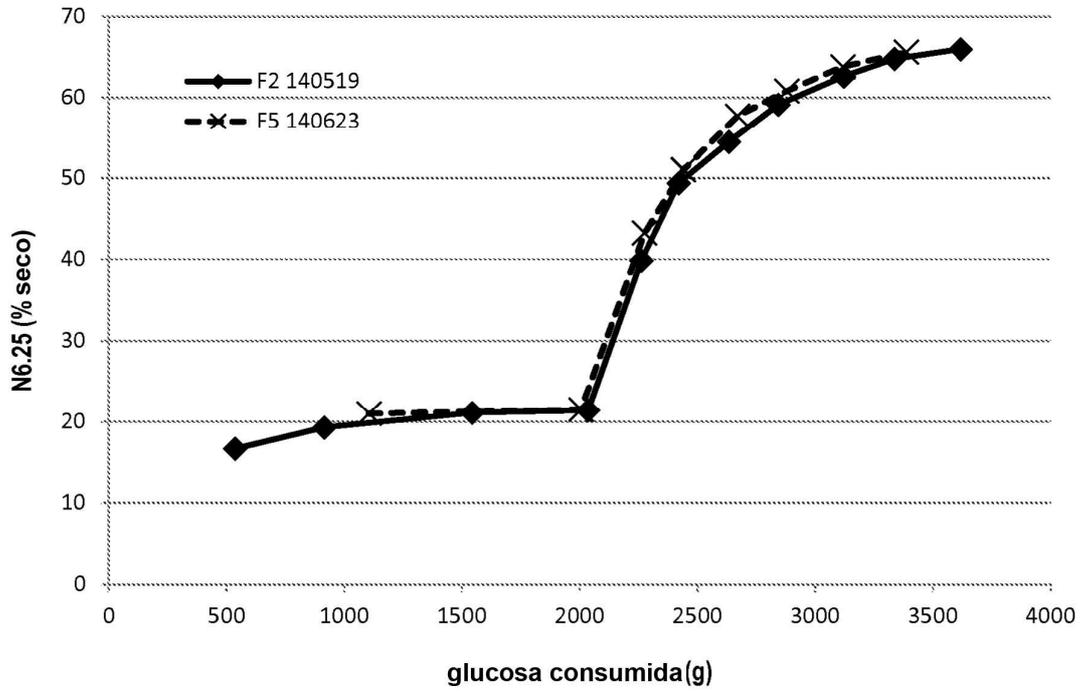


Figura 2

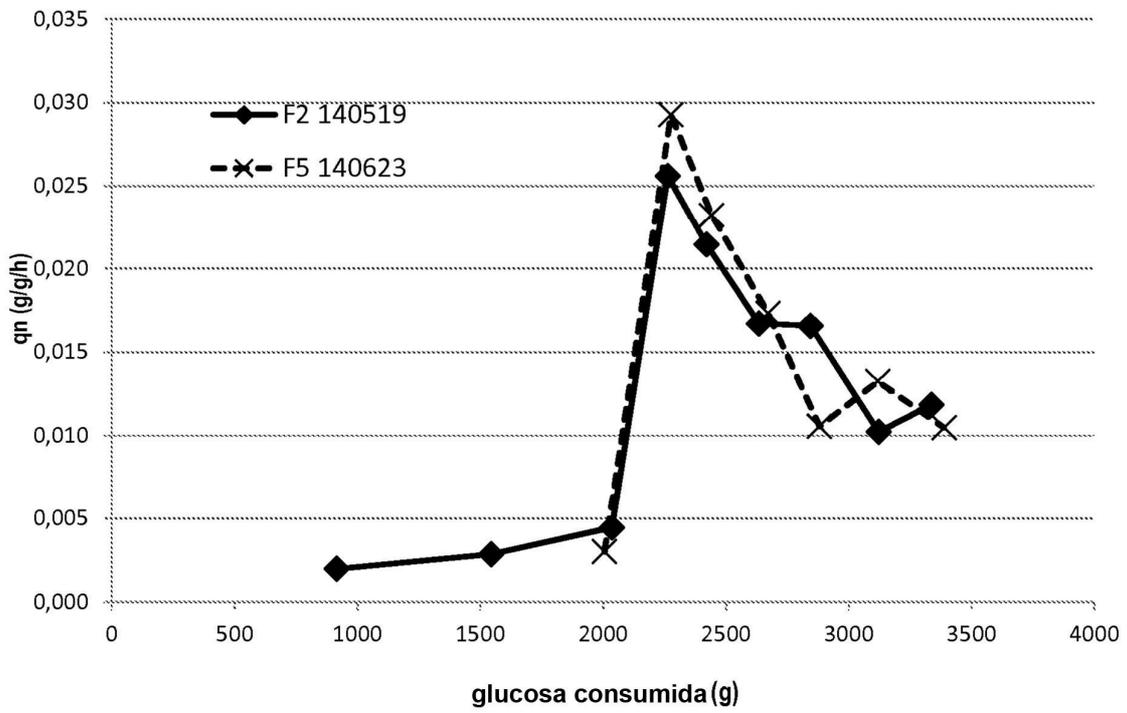


Figura 3

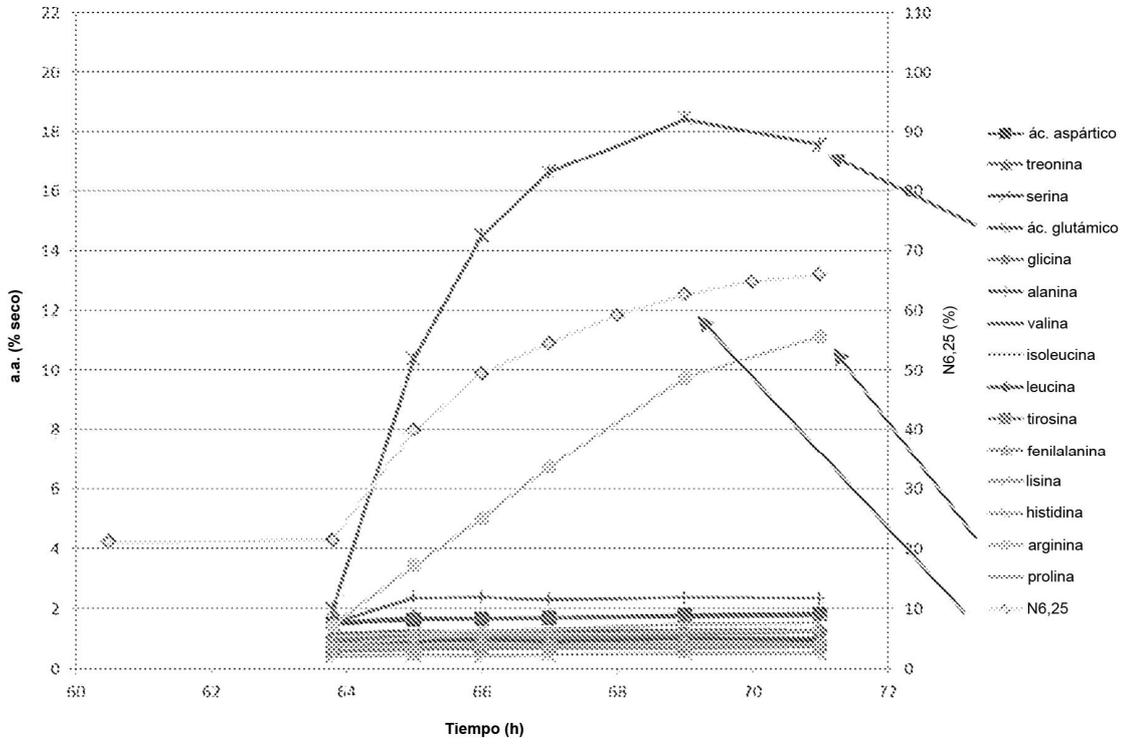


Figura 4

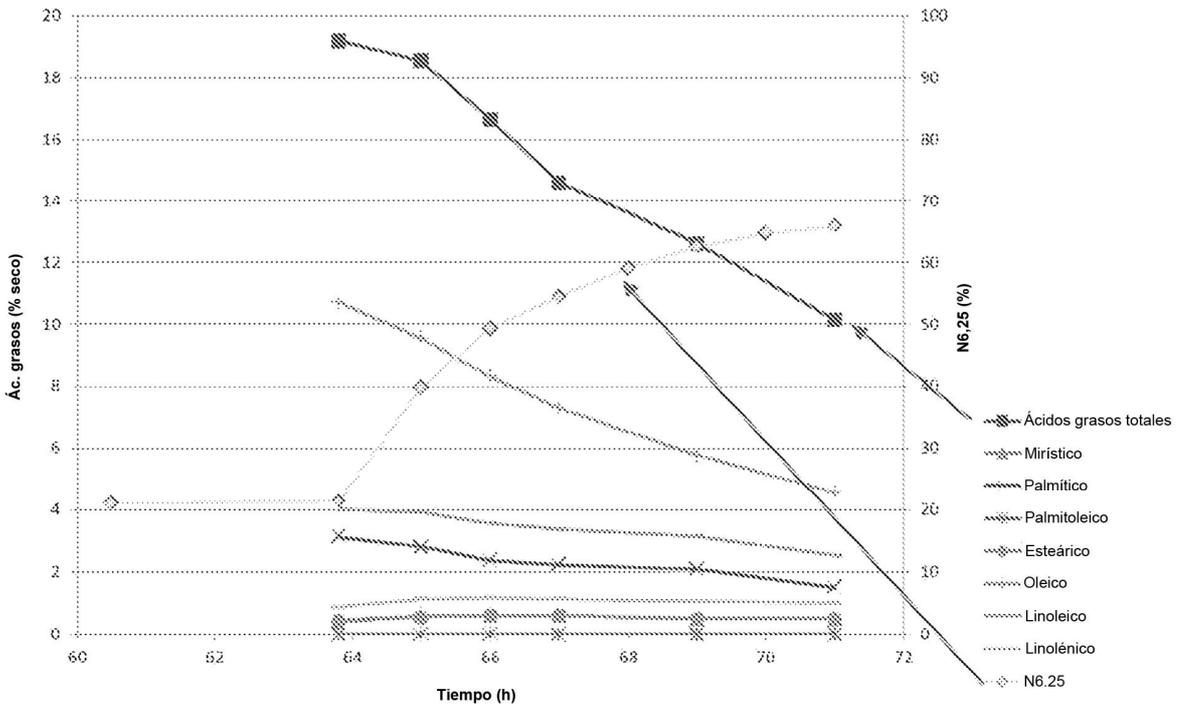


Figura 5

