

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 793 935**

51 Int. Cl.:

C12P 23/00 (2006.01)

C12N 1/12 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.11.2014** **PCT/FR2014/053075**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.06.2015** **WO15079182**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2014** **E 14827466 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020** **EP 3074522**

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

30 Prioridad:

29.11.2013 FR 1361837

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

17.11.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

COSSART, MATHIEU;
DEFRETIN, SOPHIE;
MACQUART, GABRIEL y
SEGUEILHA, LAURENT

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 793 935 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 carotenoides y en proteínas de la biomasa de microalgas

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

- 5 Las algas, macro y micro, tienen una riqueza específica en gran parte inexplorada. Su explotación con fines alimenticios, químicos o bioenergéticos sigue siendo muy marginal. Sin embargo, las algas esconden componentes de gran valor.

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

- 10 Las algas y microalgas son, por lo tanto, de interés para el sector industrial, que las utiliza para la fabricación de complementos alimenticios, alimentos funcionales, cosméticos, medicamentos o para la acuicultura.

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

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

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

Además, se estima que el cultivo en condiciones heterotróficas cuesta 10 veces menos que en condiciones fototróficas porque, 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 de cultivo, y
- la producción de biomasa en una cantidad mucho más grande que la que se obtiene por cultivo basado en la luz.

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

- 25 - los pigmentos (clorofila a, b y c, β -caroteno, astaxantina, luteína, ficocianina, xantofilas, ficoeritrina ...) cuya demanda es creciente, tanto por sus notables propiedades antioxidantes como por su aporte de colores naturales en la alimentación,
- las proteínas, con el fin de optimizar las cualidades nutritivas; o
- 30 - los lípidos, con el fin de optimizar su contenido de ácidos grasos (hasta 60 %, véase 80 % en peso de su materia seca) especialmente para:
- las aplicaciones como biocombustibles, pero también
 - las aplicaciones en alimentación humana o animal, cuando las microalgas seleccionadas producen ácidos grasos poliinsaturados o PUFA denominados "esenciales" (es decir, aportados por la alimentación ya que no son producidos naturalmente por el hombre ni por el animal).

- 35 La utilización de microalgas del género *Chlorella* para producir carotenoides también está descrita en la técnica anterior, especialmente en las patentes US2949700, US3142135 y US3103402 y en el artículo de Sansawa and Endo (J. Biosci Bioeng. 2004; 98(6): 437-44), igual que la utilización del alga verde *Haematococcus pluvialis* para la producción de astaxantina (documento EP1724357).

- 40 Para llegar a este resultado, se han trabajado en gran medida los primeros procedimientos de fermentación que permiten obtener altas densidades celulares (acrónimo en inglés: HCD para High-Cell-Density), para obtener los máximos rendimientos y productividades en proteínas o en lípidos

El objetivo de estos cultivos HCD era la obtención de la concentración más alta posible del producto deseado en el periodo de tiempo más corto.

- 45 Este precepto se verifica, por ejemplo, para la biosíntesis de astaxantina por *Chlorella zofingiensis*, donde el crecimiento de la microalga se ha demostrado que está directamente relacionado con la producción de este compuesto (Wang and Peng, 2008, World J Microbiol. Biotechnol., 24 (9), 1915-1922).

Sin embargo, el hecho de mantener el crecimiento en su tasa máxima (μ , en h⁻¹) no siempre está correlacionado con la producción elevada del producto deseado.

Para los especialistas en este campo se ha hecho evidente rápidamente que es necesario, por ejemplo, someter a las microalgas a un estrés nutricional que limite su crecimiento cuando se desea hacerlas producir grandes reservas lipídicas.

Por lo tanto, se procede ahora a la disociación del crecimiento/producción en los procedimientos de fermentación.

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

10 En la microalga *Schizochytrium sp* cepa ATCC 20888, se procede así a una primera fase de crecimiento sin limitación de oxígeno, para favorecer la obtención de una alta densidad celular (más de 100 g/L) después, en una segunda fase, ralentizar progresivamente el aporte de oxígeno, con el fin de estresar a la microalga, ralentizar su crecimiento y desencadenar la producción de ácidos grasos de interés.

En la microalga *Cryptocodinium cohnii*, el contenido más alto de ácido docosahexaenoico (DHA, ácido graso poliinsaturado) se obtiene a una baja concentración de glucosa (del orden de 5 g/L) y, de este modo, a una baja tasa de crecimiento (Jiang and Chen, 2000, Process Biochem., 35 (10), 1205-1209).

- 15 Estos resultados ilustran claramente el hecho de que las cinéticas de formación de los productos se pueden asociar tanto de forma positiva como de forma negativa con el crecimiento de las microalgas, o incluso con una combinación de las dos.

Por lo tanto, en los casos en que la formación del producto no se correlaciona con un crecimiento celular elevado, es aconsejable controlar la tasa de crecimiento celular.

- 20 En general, los expertos en la técnica eligen controlar el crecimiento de las microalgas mediante el control de las condiciones de fermentación (Tp, pH...) o mediante la alimentación controlada en componentes nutricionales del medio de fermentación (condiciones semicontinuas denominadas "fed batch").

25 Si eligen controlar el crecimiento de las microalgas en heterotrofia mediante el aporte de fuentes de carbono, los expertos en la técnica generalmente eligen adaptar la fuente de carbono (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:

- 30 - por ejemplo, se ha informado que la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados en ciertas especies de microalgas, tal como el EPA por la *Chlorella minutissima*, se favorece a una temperatura más baja que la requerida para el crecimiento óptimo de dicha microalga;

- por el contrario, el rendimiento en luteína es más elevado en la *Chlorella protothecoides* cultivada en heterotrofia, cuando se aumenta la temperatura de producción de 24 a 35 °C.

La *Chlorella protothecoides* es precisamente reconocida como una de las mejores microalgas productoras de aceite.

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

Para optimizar esta producción de triglicéridos, los expertos en la técnica deben optimizar el flujo de carbono hacia la producción de aceite, actuando sobre el entorno nutricional del medio de fermentación.

Se conoce por lo tanto, que la acumulación de aceite se produce durante un aporte suficiente de carbono, pero en condiciones de deficiencia de nitrógeno.

- 40 La relación C/N es aquí por lo tanto determinante, y se admite que los mejores resultados se obtienen actuando directamente sobre el contenido de nitrógeno, sin que el contenido de glucosa sea limitante.

De manera no sorprendente, esta deficiencia de nitrógeno afecta al crecimiento celular, lo que da como resultado una tasa de crecimiento un 30 % más baja que la tasa de crecimiento normal de la microalga (Xiong et al., Plant Physiology, 2010, 154, pág. 1001-1011).

- 45 Para explicar este resultado, Xiong et al, en el artículo citado anteriormente, demuestran en efecto que si se divide la biomasa de *Chlorella* en sus 5 componentes principales, esto es, 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 sobre el contenido de ADN, ARN e hidratos de carbono, se vuelve predominante para el contenido de proteínas y de lípidos.

50 En consecuencia, las células de *Chlorella* cultivadas con una baja relación C/N contienen 25,8 % de proteínas y 25,23 % de lípidos, mientras que una alta relación C/N permite la síntesis de 53,8 % de lípidos y 10,5 % de proteínas.

Para optimizar su producción de aceite, es primordial por lo tanto, para los expertos en la técnica controlar el flujo de carbono desviándolo hacia la producción de aceite, en detrimento de la producción de proteínas; el flujo de carbono se redistribuye y se acumula en sustancias de reserva lipídicas cuando las microalgas se colocan en un medio deficiente en nitrógeno.

5 Como fruto de esta enseñanza, para la producción de biomasa rica en proteínas, los expertos en la técnica se ven obligados a adoptar medidas opuestas a este control metabólico, es decir, a trabajar en condiciones de fermentación que favorecen más bien una relación C/N baja, y por lo tanto:

- realizar un aporte importante de la fuente de nitrógeno al medio de fermentación, mientras se mantiene constante la carga de la fuente de carbono que se convertirá en proteínas y

10 - estimular el crecimiento de la microalga.

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

En el marco de la invención, la compañía solicitante ha optado por explorar una vía original proponiendo una solución alternativa a la prevista convencionalmente por los expertos en la técnica.

15 La invención se refiere así a un procedimiento de enriquecimiento en carotenoides y en proteínas de una biomasa de microalga cultivada en heterotrofia, microalga del género *Chlorella*, más particularmente todavía *Chlorella sorokiniana*, procedimiento de cultivo heterotrófico que comprende un cultivo de dicha microalga en un medio mínimo, complementado con una fuente de nitrógeno que es un extracto de levaduras.

En el sentido de la invención, por "el enriquecimiento":

20 - en carotenoides: se entiende un aumento del contenido en carotenoides de la biomasa de al menos 0,05 %, preferiblemente de al menos 0,1 % del peso total de la biomasa con respecto al contenido en carotenoides de la biomasa cultivada únicamente en el medio mínimo. Preferiblemente, la biomasa obtenida por el procedimiento según la invención tiene un contenido en carotenoides de al menos 0,35 % del peso total de la biomasa, de manera más particularmente preferible de al menos 0,4 % del peso total de la biomasa

25 - en proteínas: se entiende un aumento del contenido en proteínas de la biomasa de al menos 5 %, preferiblemente de al menos 10 % del peso total de la biomasa con respecto al contenido en proteínas de la biomasa cultivada únicamente en el medio mínimo. Preferiblemente, la biomasa obtenida por el procedimiento según la invención tiene un contenido en proteínas de al menos 45 % del peso total de la biomasa, de manera más particularmente preferible de al menos 50 % del peso total de la biomasa.

30 En el sentido de la invención, el "medio mínimo" se define convencionalmente como un medio que no comprende más que los elementos químicos estrictamente necesarios para el crecimiento de la microalga, en una forma utilizable por las microalgas que no tienen ninguna exigencia particular.

El medio mínimo contiene entonces:

- una fuente de carbono y de energía: generalmente glucosa

35 - una fuente de potasio y de fósforo: por ejemplo, K_2HPO_4

- una fuente de nitrógeno y de azufre: por ejemplo $(NH_4)_2SO_4$

- una fuente de magnesio: por ejemplo $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

- una fuente de calcio: por ejemplo $CaCl_2 \cdot 2H_2O$

- una fuente de hierro: por ejemplo, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$

40 - fuentes de oligoelementos: sales de Cu, Zn, Co, B, Mn, Mo

- fuentes de vitaminas (tiamina, biotina, vitamina B12 ...).

45 La compañía solicitante ha encontrado por tanto que aunque el cultivo de microalgas del género *Chlorella*, más particularmente aún *Chlorella sorokiniana*, en este medio mínimo, esencialmente mineral, permitía siempre producir una biomasa importante, esto se hacía en detrimento de componentes de interés, tales como los carotenoides y las proteínas.

La alta tasa de crecimiento de la biomasa (más de $0,05 \text{ h}^{-1}$) en un medio esencialmente mineral traduce en especial la autotrofia de la cepa en nitrógeno.

Sin limitarse a ninguna teoría, la compañía solicitante ha emitido entonces la hipótesis según la cual un cultivo de microalgas en medio mínimo orientaba las vías metabólicas hacia la producción de sustancias de reserva (de tipo polisacáridos).

5 La compañía solicitante ha encontrado por tanto que el aporte, en pequeña cantidad (preferiblemente el aporte de nitrógeno sigue siendo mineral en más del 90 %) de un complemento nutricional nitrogenado en forma orgánica, es decir, en forma de extractos de levadura, en estas condiciones particulares (mientras que la microalga es perfectamente autotrófica para el nitrógeno) permitía ralentizar la producción de dichas sustancias de reserva polisacáridas y desviar las vías metabólicas hacia la producción de carotenoides y de proteínas.

10 Este procedimiento de fermentación permite entonces manejar fácilmente, en medio mínimo, la adición de los complementos nutricionales nitrogenados que aumentan la producción de carotenoides y de proteínas.

Esta estrategia por lo tanto, va en contra del prejuicio técnico según el cual para aumentar por ejemplo el contenido en proteínas de la biomasa, es inevitable aumentar esta biomasa y, por lo tanto, el crecimiento celular, o estimular el medio de fermentación con fuentes de nitrógeno.

15 En efecto, la cantidad de biomasa permanece aquí constante, y es la adición de los complementos nutricionales (preferiblemente menos del 10 % en peso del nitrógeno total añadido al medio de fermentación) la que conduce a la superproducción de proteínas.

Así, la presente invención se refiere a un procedimiento de enriquecimiento en carotenoides y en proteínas de una biomasa de microalga cultivada en heterotrofia, comprendiendo el procedimiento de cultivo heterotrófico el cultivo de dicha microalga en un medio mínimo complementado con una fuente de nitrógeno en forma orgánica.

20 La microalga es del género *Chlorella*, en particular una microalga rica en pigmentos elegida entre *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris* y *Chlorella kessleri*, y de manera más particularmente preferible *Chlorella sorokiniana*.

La fuente de nitrógeno en forma orgánica es un extracto de levadura. Preferiblemente, el extracto de levadura se obtiene de *Saccharomyces cerevisiae*.

25 La fuente de nitrógeno en forma orgánica se añade al medio mínimo que comprende una fuente de nitrógeno mineral. El aporte de nitrógeno en forma orgánica no excede del 10 % del nitrógeno total contenido en el medio de fermentación (fuentes minerales y orgánicas acumuladas).

La fuente mineral de nitrógeno en el medio mínimo puede ser, por ejemplo, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o NH_4Cl .

30 El medio mínimo puede ser complementado con 0,5 a 3 g/L de extracto de levadura, preferiblemente 1 a 2 g/L de extracto de levadura. De manera más particularmente preferible, el medio mínimo se complementa con aproximadamente 1 g/L de extracto de levadura. Como se utiliza en la presente memoria, el término "aproximadamente" se refiere a un valor +/- 20 %, 10 %, 5 % o 2 %.

35 Según un modo de realización, el procedimiento según la invención permite aumentar el contenido en proteínas de la biomasa al menos un 5 % del peso total de la biomasa con respecto al contenido en proteínas de la biomasa cultivada únicamente en el medio mínimo. El procedimiento según la invención puede permitir aumentar el contenido en proteínas de la biomasa al menos 6, 7, 8, 9 o 10 % del peso total de la biomasa con respecto al contenido en proteínas de la biomasa cultivada únicamente en el medio mínimo.

40 Preferiblemente, el contenido de proteínas en la biomasa obtenida por el procedimiento según la invención es más del 45 %, 50 % o 55 % del peso total de la biomasa. Según otro modo de realización, el procedimiento según la invención permite aumentar el contenido en carotenoides de la biomasa al menos un 0,05 % del peso total de la biomasa con respecto al contenido en carotenoides de la biomasa cultivada únicamente en el medio mínimo. El procedimiento según la invención puede permitir aumentar el contenido en carotenoides de la biomasa al menos 0,1 o 0,2 % del peso total de la biomasa con respecto al contenido en carotenoides de la biomasa cultivada únicamente en el medio mínimo.

Preferiblemente, el contenido de carotenoides en la biomasa obtenida por el procedimiento según la invención es más de 0,35, 0,4 o 0,5 % del peso total de la biomasa.

45 Según otro aspecto, la presente invención se refiere también a un procedimiento de cultivo heterotrófico de microalgas que comprende:

- una primera etapa de cultivo de las microalgas en un medio mínimo, y
- una segunda etapa de cultivo en la cual se añade al medio mínimo una fuente de nitrógeno en forma orgánica que es un extracto de levadura.

50 La primera etapa permite el crecimiento de las microalgas y la segunda etapa impide la acumulación de sustancias de reserva polisacáridas y permite enriquecer la biomasa en proteínas y carotenoides.

La microalga es del género *Chlorella*, preferiblemente elegida entre *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris* y *Chlorella kessleri*, y más preferiblemente es *Chlorella sorokiniana*.

La presente invención se refiere más particularmente a un procedimiento de cultivo heterotrófico de dichas microalgas, en particular *Chlorella sorokiniana*, que comprende:

- 5 - una primera etapa de crecimiento de las microalgas en medio mínimo,
- una segunda etapa en la cual se añade el extracto de levadura al medio mínimo.

La adición de la fuente de nitrógeno en forma orgánica no excede el 10 % del nitrógeno total contenido en el medio de fermentación. En particular, el medio mínimo puede ser complementado con 0,5 a 3 g/L de extracto de levadura, preferiblemente con 1 a 2 g/L de extracto de levadura.

10 Preferiblemente, la segunda etapa de cultivo permite aumentar

- el contenido en carotenoides de la biomasa al menos 0,05 %, preferiblemente al menos 0,1 % del peso total de la biomasa con respecto al contenido en carotenoides de la biomasa cultivada únicamente en medio mínimo, y/o
- el contenido en proteínas de la biomasa al menos 5 %, preferiblemente al menos 10 % del peso total de la biomasa con respecto al contenido en proteínas de la biomasa cultivada únicamente en medio mínimo.

15 Según un modo preferido, el contenido de la biomasa obtenida

- en carotenoides es al menos 0,35 % del peso total de la biomasa, preferiblemente al menos 0,4 % del peso total de la biomasa, y/o
- en proteínas es al menos 45 % del peso total de la biomasa, preferiblemente al menos 50 % del peso total de la biomasa.

20 Opcionalmente, como se ejemplificará a continuación, en la segunda etapa, el aporte de glucosa se realiza en modo continuo, con un valor claramente por debajo de la capacidad de consumo de glucosa de dichas microalgas.

Los modos de realización descritos anteriormente y que se refieren al procedimiento de enriquecimiento en carotenoides y en proteínas de una biomasa de microalga, se contemplan también en este aspecto.

25 La invención se entenderá mejor con la ayuda de los ejemplos que siguen, los cuales pretenden ser ilustrativos y no limitativos.

Ejemplo

Producción de *C. sorokiniana* - adición de extracto de levadura

La cepa utilizada es *Chlorella sorokiniana* UTEX 1663.

Precultivo:

- 30 - 600 mL de medio en un matraz Erlenmeyer de 2 L;
- Composición del medio:

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

El pH se ajusta a 7 antes de la esterilización mediante la adición de NaOH 8 N

5 La incubación se desarrolla en las siguientes condiciones: duración: 72 h; temperatura: 28 °C; agitación: 110 rpm (incubador Infors Multitron).

El precultivo se transfiere a continuación a un fermentador de 30 L de tipo Sartorius.

Cultivo para producción de biomasa:

El medio de base es idéntico al del precultivo, pero la urea se reemplaza por NH₄Cl:

Macroelementos (g/L)	Glucosa	20
	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,7
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,34
	Ácido cítrico	1,0
	NH ₄ Cl	1,88
	Na ₂ SO ₄	0,2
	Clerol FBA 3107 (antiespuma)	0,5
Microelementos (mg/L)	Na ₂ EDTA	10
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	80
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	40
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,41
	CoSO ₄ ·7H ₂ O	0,24
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,24
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,5
	H ₃ BO ₃	0,11
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₇ ·4H ₂ O	0,04

10 Ensayo 1: testigo; no se añade ningún complemento nutricional

Ensayo 2: se añade 1 g/L de extracto de levadura.

El volumen inicial (Vi) del fermentador se ajusta a 13,5 L después de la siembra. Se lleva a 16-20 L al final.

Los parámetros de realización de la fermentación son los siguientes:

Temperatura	28 °C
pH	6,5 – 6,8 mediante NH ₃ al 28 % p/p
pO ₂	> 20 % (mantenido por agitación)
Agitación	300 RPM míni
Caudal de aire	15 L/min

Cuando se consume la glucosa aportada inicialmente, se produce un aporte de medio similar al medio inicial en forma de una solución concentrada que contiene especialmente 500 g/L de glucosa.

La siguiente tabla muestra la composición de un litro de esta solución concentrada:

Macro elementos (g)	Glucosa	500
	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	34
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	8,5
	Ácido cítrico	25
	Na ₂ SO ₄	5,0
Microelementos (mg)	Na ₂ EDTA	250
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	2000
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	1000
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	10
	CoSO ₄ ·7H ₂ O	6
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	6
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	12
	H ₃ BO ₃	3
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₇ ·4H ₂ O	1

5

Las concentraciones de los elementos distintos de la glucosa han sido determinadas de modo que estén en exceso con respecto a las necesidades nutricionales de la cepa.

Esta solución se aporta de forma continua a una velocidad inferior a la capacidad de consumo de glucosa de la cepa. De esta manera, el contenido residual de glucosa en el medio se mantiene nulo, es decir que el crecimiento de la cepa está limitado por la disponibilidad de glucosa (condición de glucosa limitante).

10

Esta velocidad se aumenta a lo largo del tiempo de forma exponencial según la siguiente fórmula:

$$S = 12 \cdot \exp(0,07 \cdot t)$$

donde S = caudal de aporte de glucosa (en g/h) y t = duración del *fed-batch* (en h)

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

15

Resultados: efecto de la adición de extracto de levadura

El contenido en proteína de la biomasa obtenida se evalúa midiendo el nitrógeno total expresado en N 6,25.

Ensayo	Medio	Duración (h)	Biomasa (g/L)	% N 6,25	% de carotenoides
1	Base	72	75,7	40,0	0,3
2	Base + 1 g/L de extracto de levadura	71	76,3	50,2	0,4

Estos resultados muestran que el hecho de aportar un complemento nutricional en forma de extracto de levadura permite obtener una concentración alta de biomasa con un contenido en proteína superior al 50 %.

20

El contenido en carotenoides también aumenta.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de enriquecimiento en carotenoides y en proteínas de una biomasa de microalga del género *Chlorella* cultivada en heterotrofia, que comprende el cultivo de dicha microalga en un medio mínimo complementado con una fuente de nitrógeno en forma orgánica, en el cual dicha fuente de nitrógeno se añade en una cantidad tal que el nitrógeno en forma orgánica no excede del 10 % del nitrógeno total contenido en el medio de fermentación, y en el cual la fuente de nitrógeno en forma orgánica es extracto de levadura.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la microalga se elige entre *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris* y *Chlorella kessleri*, preferiblemente es *Chlorella sorokiniana*.
- 10 3. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el medio mínimo se complementa con 0,5 a 3 g/L de extracto de levadura, preferiblemente con 1 a 2 g/L de extracto de levadura .
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el contenido en carotenoides de la biomasa obtenida es al menos 0,35 % del peso total de la biomasa, preferiblemente al menos 0,4 % del peso total de la biomasa.
- 15 5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el contenido en proteínas de la biomasa obtenida es al menos 45 % del peso total de la biomasa, preferiblemente al menos 50 % del peso total de biomasa.
6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque comprende
- una primera etapa de cultivo de las microalgas en un medio mínimo, y
 - una segunda etapa de cultivo en la cual se añade el extracto de levadura al medio mínimo.
- 20 7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque comprende:
- una primera etapa de crecimiento de las microalgas del tipo *Chlorella sorokiniana* en medio mínimo,
 - una segunda etapa de cultivo en la cual se añade el extracto de levadura al medio mínimo.