



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 193 860**

② Número de solicitud: 200102805

⑤ Int. Cl.7: **C12N 1/12**
// (C12N 1/12
C12R 1:89)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **17.12.2001**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.11.2003**

Fecha de la concesión: **18.01.2005**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.03.2005**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.03.2005

⑰ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad de Sevilla y Junta de Andalucía**

⑱ Inventor/es: **García González, Mercedes;
Moreno Fernández, José;
Manzano Harriero, José Carlos;
Florencio Bellido, Francisco Javier y
García Guerrero, Miguel**

⑲ Agente: **Represa Sánchez, Domingo**

⑳ Título: **Procedimiento para el cultivo de *Dunaliella salina* rica en β -caroteno en fotobiorreactor tubular cerrado a la intemperie.**

㉑ Resumen:

Procedimiento para el cultivo de *Dunaliella salina* rica en β -caroteno en fotobiorreactor tubular cerrado a la intemperie.

El objeto de la presente invención es un procedimiento para el cultivo a la intemperie de la microalga *Dunaliella salina* rica en β -caroteno que utiliza un fotobiorreactor tubular cerrado como alternativa a los sistemas abiertos. Mediante el procedimiento de la invención se alcanzan elevados valores de productividad tanto de biomasa como de carotenoides. Este sistema posibilita un control estricto del proceso de cultivo y, consecuentemente, permite asegurar la constancia de composición y calidad del producto.

ES 2 193 860 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Procedimiento para el cultivo de *Dunaliella salina* rica en β -caroteno en fotobiorreactor tubular cerrado a la intemperie.

Objeto de la invención

El objeto de la presente invención es un procedimiento para el cultivo de la microalga *Dunaliella salina* rica en β -caroteno que utiliza un fotobiorreactor tubular cerrado como alternativa a los sistemas abiertos. Mediante el procedimiento de la invención se alcanzan elevados valores de productividad tanto de biomasa como de carotenoides. Este sistema posibilita un control estricto del proceso de cultivo y, consecuentemente, permite asegurar la constancia de composición y calidad del producto.

Estado de la técnica

La microalga *Dunaliella salina* se produce comercialmente desde finales de los años 80 como fuente natural de β -caroteno. Para su cultivo se vienen empleando sistemas abiertos en tanques de gran superficie, con escaso o nulo control del proceso. La baja productividad, el elevado consumo de CO_2 , la imposibilidad de controlar los factores ambientales y problemas de contaminación han dificultado la generalización de estos sistemas de cultivo, aun cuando el pigmento obtenido de forma natural presenta ventajas frente al sintetizado químicamente. Está ampliamente reconocido el papel del β -caroteno en la prevención del cáncer y otras enfermedades degenerativas. Estudios epidemiológicos indican que la capacidad antioxidante de este compuesto reside fundamentalmente en el isómero 9-cis, presente en el β -caroteno natural.

El cultivo de microalgas en fotobiorreactores tubulares cerrados constituye una alternativa muy interesante a los sistemas de tanques abiertos, ya que solventa importantes limitaciones presentes en estos últimos. Existen antecedentes de utilización de foto biorreactores análogos al aquí utilizado para el cultivo de otras microalgas de interés (patente FR2685344), así como diversas patentes relacionadas con otros diseños de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas (US5981271 y DE19912952). Por otro lado, se pueden encontrar patentes relacionadas con el cultivo de *Dunaliella* pero que emplean sistemas abiertos (JP57159484), (IL54881), (CN1044200). Por último, se encuentra patentado el diseño de un biorreactor cerrado, aunque de características muy diferentes al aquí utilizado, donde se emplea la microalga *Dunaliella bardawil* para testar el funcionamiento de dicho biorreactor (US5958761).

Explicación de la invención

El objeto de la presente invención es un procedimiento para el cultivo a la intemperie de *Dunaliella salina* rica en β -caroteno mediante la utilización de un fotobiorreactor tubular cerrado y que comprende las etapas de:

a) introducción en el fotobiorreactor de una suspensión de células en medio de cultivo de *Dunaliella salina* con una densidad comprendida entre 10^6 y 2×10^6 células ml^{-1} .

b) circulación de la suspensión celular por el fotobiorreactor a una velocidad comprendida en-

tre 0,2 y 0,4 m s^{-1} durante un periodo comprendido entre 24 y 240 horas sin control de temperatura o temperatura mantenida constante a 25°C y sometida a una irradiancia diaria comprendida entre 2 y 13 MJ m^{-2} .

c) recogida de la biomasa de *Dunaliella salina* contenida en el fotobiorreactor.

El sistema de cultivo se encuentra a la intemperie y la fuente de iluminación es la luz solar y los tubos por los que circula la suspensión celular son de un material transparente o translúcido, tienen un diámetro exterior comprendido entre 30 y 60 mm y una longitud comprendida entre 90 y 150 m. La circulación de la suspensión celular se realiza mediante impulsión de aire a presión, evitándose el depósito de células en las paredes de los mismos mediante la circulación de dos bolas de caucho de diámetro ligeramente inferior al diámetro interior de los tubos (FR2674458).

Durante el proceso el pH se mantiene entre un valor de 6,5 y 7,5 mediante la inyección de CO_2 a través de una electroválvula regulada por un controlador de pH. La temperatura se mantiene constante a 25°C o alternativamente la temperatura máxima se controla a 25°C , sin regular la temperatura por debajo de este valor.

Preferentemente, la suspensión celular se mantiene circulando por los tubos durante un periodo comprendido entre 72 y 120 horas con una velocidad comprendida entre 0,3 y 0,4 ms^{-1} y una irradiancia diaria comprendida entre 5 y 7 MJ m^{-2} .

Breve descripción de la figura

Esquema del fotobiorreactor tubular utilizado para el cultivo de *Dunaliella salina* rica en β -caroteno

Descripción detallada de la invención

El procedimiento objeto de la presente invención se ilustra en detalle mediante el siguiente ejemplo:

Elementos del fotobiorreactor

Los cultivos de *Dunaliella salina* se llevan a cabo a la intemperie en un fotobiorreactor tubular cerrado (patente n° FR2685344). El sistema consta de un módulo de captación de luz solar constituido por tubos de material transparente (plexiglás rígido) (1) de 24 mm de diámetro interno y 30 mm de diámetro externo y una longitud total de 90 m, situados en paralelo y conectados entre sí por medio de piezas en forma de "u" del mismo material, con una superficie fotosintéticamente activa de 2,2 m^2 y 55 l de volumen útil. Dos bolas de caucho de diámetro ligeramente inferior al diámetro interior de los tubos circulan para evitar el depósito de células en las paredes de los mismos (FR2674458). Estos tubos se encuentran sumergidos en agua, que actúa como elemento termostatizador del cultivo, en un baño (2) de dimensiones 1,8 x 6,0 x 0,15 m, provisto de circuito cerrado de circulación con elementos calefactores y enfriadores (3). En este sistema de cultivo, la suspensión celular se agita y se hace circular a través de los tubos por la impulsión de aire estéril a presión generado por un compresor (air-lift) (4). El sistema tubular termina en un cilindro (5) de 52 cm de alto por 26 de diámetro externo, situado a 2,8 m de altura desde la horizontal del reactor. En la tapa de este cilindro existen varios

orificios (6) para: salida de gas (protegido por un filtro para prevenir la entrada de bacterias), entrada para llenado rápido del reactor, entrada de medio fresco para operar en cultivo continuo y sensor de nivel. En la parte inferior del cilindro se encuentran además sondas de pH (7) y temperatura (8). Estas sondas se conectan con una unidad de control (9).

Condiciones óptimas para el cultivo de Dunaliella salina

No se conoce experiencia previa del cultivo de *Dunaliella* en fotobiorreactor tubular cerrado. Por ello, a partir del conocimiento del que se dispone sobre la fisiología y bioquímica de este alga, han debido verificarse su crecimiento y definirse las condiciones óptimas para su cultivo en este sistema, considerando diversas variables, tales como temperatura, irradiancia, densidad celular inicial y velocidad de circulación. Para la realización de este trabajo se ha utilizado una estirpe de *Dunaliella salina* aislada de una salina en Roquetas de Mar (Almería). Los cultivos se han desarrollado en régimen semicontinuo, retirando cada 4 días un volumen de la suspensión celular y reemplazándolo por medio de cultivo fresco para alcanzar la densidad celular inicial.

Temperatura.- Una de las ventajas que presenta este sistema es la posibilidad de controlar la temperatura. Se han realizado experiencias en 3 condiciones: temperatura constante de 25°C (óptima para el cultivo de *Dunaliella* en condiciones de laboratorio), control de la temperatura máxima a 25°C sin regular la temperatura por debajo de este valor, y ausencia de control de temperatura. Los resultados muestran que la condición óptima para obtener las mayores productividades es la de mantenimiento constante de la temperatura a 25°C, para la que se obtienen unos valores de productividad de hasta 3 g m⁻² día⁻¹ en biomasa y de 0,2 g m⁻² día⁻¹ en carotenoides (más del 90 % de la fracción de carotenoides determinada corresponde a β-caroteno), en condiciones de alta irradiancia solar.

Densidad celular.- Los mejores resultados se obtuvieron con una densidad celular inicial de 10⁶ células ml⁻¹. Densidades iniciales inferiores a ésta no eran viables en este sistema y con valores superiores se reducía la productividad.

Velocidad de circulación de la suspensión celular.- La agitación es un parámetro clave en los cultivos en fotobiorreactor tubular cerrado a la intemperie y de dimensiones relativamente grandes, ya que facilita el intercambio de gases y la exposición de las células a la luz. Los valores máximos de productividad de biomasa y carotenoides se obtienen a la mayor velocidad de circulación de la suspensión celular que permite el sistema (0,4 m s⁻¹). *Irradiancia.*- Los cultivos en fotobiorreactor tubular cerrado persiguen la consecución de condiciones en las que se obtenga el máximo aprovechamiento de la luz disponible por la suspensión celular, intentando aproximar la eficiencia fotosintética al máximo teórico. Sin embargo, un exceso de irradiancia puede provocar daños fotooxidativos que limiten el crecimiento del cultivo. Se han realizado experiencias en dos condiciones: máxima irradiancia solar disponible y reducción de ésta mediante la utilización de una malla que filtra el 50 % de la luz incidente. En estas condiciones, la productividad en biomasa no se afecta significativamente. Sin embargo, la productividad en carotenoides es un 50 % mayor en los cultivos realizados sin malla.

Comparación de la productividad en sistemas abiertos y en fotobiorreactor tubular

Se ha realizado un estudio comparativo de la productividad en el sistema cerrado descrito anteriormente, operando en condiciones óptimas, y en un sistema abierto de tanques de 1 m² de superficie abierta al aire. Estos tanques están contruidos con poliéster y fibra de vidrio con unas dimensiones de 1,25 m de largo x 0,8 m de ancho y 0,3 m de altura, divididos longitudinalmente por un tabique vertical y dos pantallas curvas en cada extremo. Las condiciones de operación de este sistema abierto son: profundidad de 3 cm (30 l de suspensión celular), suministro constante de CO₂ (3 l h⁻¹) durante las horas de luz, agitación mediante paletas que consigue una velocidad de la suspensión celular de 0,55 m s⁻¹, y sin control de temperatura. Los cultivos en fotobiorreactor tubular cerrado alcanzan productividades de 3 y 0,2 g m⁻² día⁻¹ en biomasa y carotenoides, respectivamente, claramente superiores a los de sistemas abiertos (1 y 0,06 g m⁻² día⁻¹).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el cultivo de *Dunaliella salina* rica en β -caroteno **caracterizado** por la utilización de un fotobiorreactor tubular cerrado a la intemperie y que comprende las etapas de:

a) introducción en el fotobiorreactor de una suspensión celular de *Dunaliella salina* con una densidad comprendida entre 10^6 y 2×10^6 células ml^{-1} .

b) circulación de la suspensión celular por el fotobiorreactor a una velocidad comprendida entre $0,2$ y $0,4 \text{ m s}^{-1}$ durante un periodo comprendido entre 24 y 240 horas sin control de temperatura o temperatura mantenida constante a 25°C y sometido a una irradiancia diaria comprendida entre 2 y 13 MJ m^{-2} .

c) recogida de la biomasa de *Dunaliella salina* contenida en el foto biorreactor.

2. Procedimiento para el cultivo de *Dunaliella salina* rica en β -caroteno según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el sistema de cultivo se encuentra a la intemperie y la fuente de iluminación es la luz solar.

3. Procedimiento para el cultivo de *Dunaliella salina* rica en β -caroteno según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque los tubos del fotobiorreactor son de un material transparente

o translúcido, tienen un diámetro exterior comprendido entre 30 y 60 mm y una longitud comprendida entre 90 y 150 m.

4. Procedimiento para el cultivo de *Dunaliella salina* rica en β -caroteno según las reivindicaciones 1-3, **caracterizado** porque la circulación de la suspensión celular se realiza mediante impulsión de aire a presión, con una velocidad comprendida entre $0,3$ y $0,4 \text{ m s}^{-1}$.

5. Procedimiento para el cultivo de *Dunaliella salina* rica en β -caroteno según las reivindicaciones 1-4, **caracterizado** porque la temperatura se mantiene constante a 25°C .

6. Procedimiento para el cultivo de *Dunaliella salina* rica en β -caroteno según las reivindicaciones 1-4, **caracterizado** porque la temperatura máxima se controla a 25°C , sin regular la temperatura por debajo de este valor.

7. Procedimiento para el cultivo de *Dunaliella salina* rica en β -caroteno según las reivindicaciones 1-6, **caracterizado** porque la suspensión celular se mantiene circulando por los tubos durante un periodo comprendido entre 72 y 120 horas.

8. Procedimiento para el cultivo de *Dunaliella salina* rica en β -caroteno según las reivindicaciones 1-7, **caracterizado** porque la irradiancia diaria está comprendida entre 5 y 7 MJ m^{-2} .

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

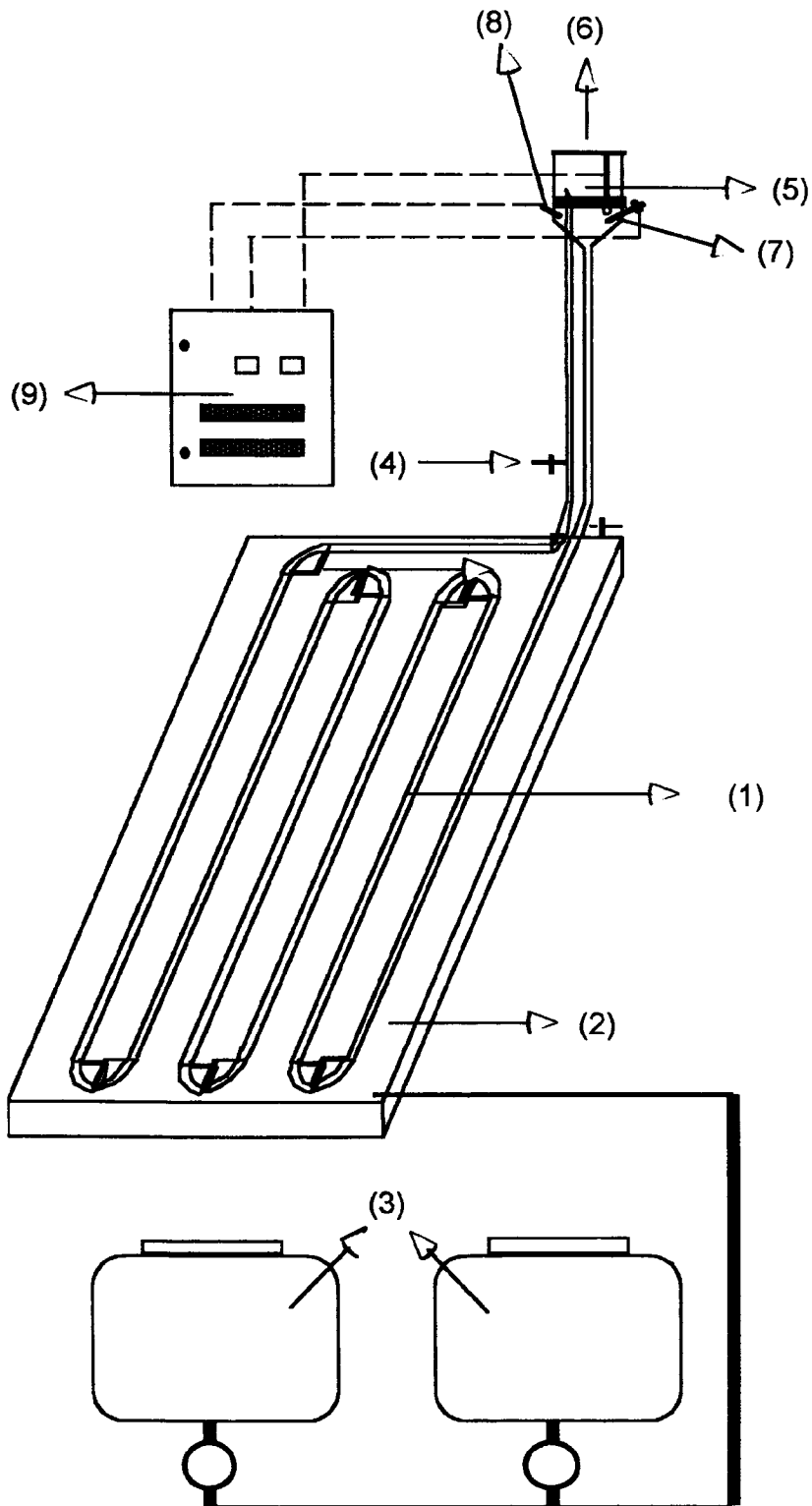


Figura 1



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 193 860

② Nº de solicitud: 200102805

③ Fecha de presentación de la solicitud: 17.12.2001

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12N 1/12 // (C12N1/12,C12R1:89)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES 2080918 T3 (HELIOSYNTHESE SA) 16.02.1996, columna 1, líneas 7-12,54-55; columna 7, líneas 22-33,52-59; reivindicaciones 1-3.	1-3
A	DE 19912952 A1 (AHN, M.V.) 05.10.2000	1-3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

18.09.2003

Examinador

I. Galíndez Labrador

Página

1/1