

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 N.º de publicación: **ES 2 071 572**

21 Número de solicitud: 9301565

51 Int. Cl.<sup>6</sup>: C12M 3/00

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **13.07.93**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.95**

Fecha de concesión: **14.12.95**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **16.01.96**

45 Fecha de publicación del folleto de patente:  
**16.01.96**

73 Titular/es: **Universidad de Granada y en su representación Francisco González Lodeiro Hospital Real Cuesta del Hospicio, s/n Granada, ES**

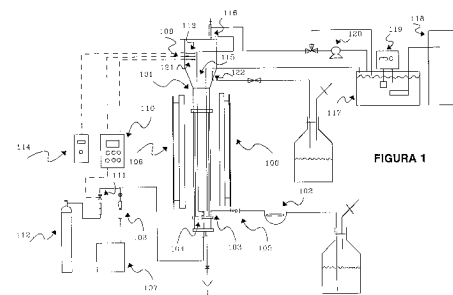
72 Inventor/es: **Contreras Gómez, Antonio; Molina Grima, Emilio; García Camacho, Francisco y Valdés Sanz, Fernando**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Dispositivo para el cultivo de microorganismos fotosintéticos y la producción de biomasa rica en ácido eicosapentaenoico.**

57 Resumen:

Un dispositivo tipo airlift con recirculación interna y tubos concéntricos, constituido por módulos independientes, de material plástico transparente, para el cultivo de microorganismos fotosintéticos y la obtención de biomasa rica en ácidos grasos poliinsaturados, en especial ácido eicosapentaenoico. El control del pH se realiza mediante la inyección de anhídrido carbónico en forma discontinua, cuando el pH del cultivo excede de un valor prefijado, y el control de la temperatura mediante agua que circula por un cambiador de calor situado en el interior del fotobiorreactor. El cultivo es iluminado por tubos fluorescentes y el dispositivo tiene posibilidad de funcionamiento discontinuo, semicontinuo o continuo.



ES 2 071 572 B1

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

## DESCRIPCION

## Estado de la Técnica

El ácido eicosapentaenoico es un ácido graso poliinsaturado que se encuentra normalmente en animales marinos y fitoplancton, y contiene 20 átomos de carbono con 5 dobles enlaces (20:5). Su fórmula se puede escribir:



Todos cis-5, 8, 11, 14, 17-Acido eicosapentaenoico

El último doble enlace está situado a tres carbonos del final de la cadena (grupo metilo terminal) por lo que forma parte del grupo conocido como ácidos omega-3 o n-3.

Los efectos beneficiosos del ácido eicosapentaenoico en la salud humana han sido reconocidos desde 1.978 (Dyerberg, J., 1986. Linolete-derived polyunsaturated fatty acids and prevention of arteriosclerosis. *Nutrition Reviews*, 44, 125-134). Estos efectos se han observado en tres áreas diferentes: corazón y circulación, inflamaciones y cáncer. La primera categoría incluye prevención y tratamiento de arteriosclerosis, trombosis e hipertensión. En la segunda categoría se incluye el tratamiento del asma, artritis, migrañas y nefritis. En la tercera categoría se incluyen principalmente el cáncer de pulmón, de próstata y de colon (Yongmanitchai, W y Ward, O., 1989. Omega-3 fatty acids: alternative sources of production. *Process Biochemistry*, August, 1989. 117-125).

Hoy día, la única fuente comercial de ácidos grasos poliinsaturados n-3 son los pescados marinos (boquerón, caballa o sardina) y sus aceites. La variedad y el contenido de ácidos grasos n-3 en los aceites de pescado depende, de la especie, de la época del año, de la localización geográfica y del lugar de captura, lo que, en último extremo, está determinado por la disponibilidad y tipos de alimentos de estos peces, es decir, microorganismos (Barlow, S.M. y Stanbay, M.E. (Eds.), 1982. Nutritional evaluation of long-chain fatty acids in fish oil. Academic Press, Londres).

Desgraciadamente, sin embargo, la mayor parte del aceite de pescado que se produce en el mundo es hidrogenado e incorporado a las margarinas. Este proceso de hidrogenación destruye los ácidos grasos n-3. Por tanto, el suministro de ácidos grasos n-3 a partir de fuentes convencionales parece ser inadecuado como suplemento para aquellas personas que los necesitan por motivos de salud (Yongmanitchai, W y Ward, O., 1989. Omega-3 fatty acids: alternative sources of production. *Process Biochemistry*, August, 1989. 117-125). Se hace necesario, por tanto, la búsqueda de fuentes no convencionales, entre las que destacan algunas especies de microalgas, que contienen cantidades considerables de ácidos grasos (Borowitzka, M.A y Borowitzka, L.J. (Eds.), 1988. Micro-algal biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge).

Las ventajas que ofrece la utilización de las microalgas como fuente alternativa de ácido eico-

sapentaenoico respecto a los aceites de pescado son diversas; desde estar libre del olor propio de éstos últimos, hasta ofrecer una materia prima fiable para los procesos de extracción cuya reproducibilidad deriva del hecho de que proviene de biomasa cultivada en condiciones controladas. Además, se encuentra libre de tóxicos (pesticidas y metales pesados), que tienden a acumularse en los lípidos y vísceras de los animales marinos, que pueden pasar a los extractos lipídicos originando un riesgo para la salud humana.

La producción de este ácido a partir de microalgas hace necesario el desarrollo de sistemas de cultivo a gran escala, en los que habrá que tener en cuenta los muchos factores que influyen en la producción de ácidos grasos poliinsaturados, en especial los n-3, por las microalgas. Cabe destacar entre los más importantes la intensidad de iluminación, la aireación, la temperatura, la composición del medio de cultivo y la edad del cultivo en el momento del cosechado.

En general se puede afirmar que la intensidad de iluminación favorece la acumulación de ácidos grasos poliinsaturados en las microalgas; además, la ausencia de luz favorece la síntesis de ácidos grasos n-6 y reduce la formación de ácidos grasos n-3, entre otros, eicosapentaenoico (Erwin, J, (Ed), 1973. Lipids and biomembranes of eucaryotic microorganisms. Academic Press, New York). Esto hace imprescindible la utilización de sistemas de cultivo que favorezcan la exposición a la luz.

Respecto a la aireación, es bien conocido que los microorganismos requieren oxígeno molecular para el mecanismo de desaturación en la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados. La disponibilidad de oxígeno determinará, por tanto, el grado de insaturación de los ácidos grasos producidos (Erwin, J, (Ed), 1973. Lipids and biomembranes of eucaryotic microorganisms. Academic Press, New York). Sin embargo, grandes cantidades de oxígeno inhiben el crecimiento, por lo que hay que suministrar oxígeno, pero evitando al mismo tiempo su acumulación en el medio.

Un tercer factor con influencia significativa en la producción de ácidos grasos poliinsaturados es la temperatura. Temperaturas bajas aumentan el contenido en ácidos grasos poliinsaturados de las microalgas, seguramente debido al incremento de la solubilidad del oxígeno molecular intracelular requerido por las enzimas dependientes del oxígeno que catalizan la desaturación de los ácidos grasos insaturados de cadena larga (Yongmanitchai, W y Ward, O., 1989. Omega-3 fatty acids: alternative sources of production. *Process Biochemistry*, August, 1989. 117-125).

Así, puesto que es conveniente utilizar temperaturas bajas, es importante la utilización de microalgas psicrófilas, con temperaturas óptimas de crecimiento por debajo de 20°C, a la vez que se hace imprescindible la utilización de sistemas con un control adecuado de temperatura.

La formulación adecuada del medio en el que ha de desarrollarse la microalga es otro factor de suma importancia, pero con efectos diferentes para diferentes microalgas. Sirva de ejemplo el hecho de que aumentar el contenido en nitrógeno del medio, favorece la acumulación de ácido eico-

sapentaenoico en unas especies pero la perjudica en otras (Piorreck, M. *et al*, 1984. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry*, **23**: 207-216).

En relación a la edad del cultivo podemos decir que a medida que aumenta la edad del cultivo, muchas microalgas tienden a almacenar energía en forma de lípidos. Estos lípidos son normalmente ricos en ácidos grasos saturados y mono-saturados. Se observa una disminución del contenido en ácidos grasos poliinsaturados en función del tiempo (Erwin, J, (Ed), 1973. Lipids and biomembranes of eucaryotic microorganisms. Academic Press, New York).

Sin embargo este comportamiento no es general, ya que en otras especies la concentración de ácidos grasos poliinsaturados y, particularmente la de eicosapentaenoico, aumenta al aumentar la edad del cultivo. Es decir, el tiempo de cultivo, o la fase de cosechado, dependerá de la especie utilizada.

Como ya se ha apuntado, la producción de este ácido a partir de microalgas, hace necesario el desarrollo de sistemas de cultivo a gran escala.

En un principio, la técnica usual para el cultivo de microorganismos fotosintéticos a gran escala había sido el estanque abierto de baja profundidad, procedimiento que es problemático y costoso en términos de espacio y mano de obra. También en estos sistemas de cultivo es frecuente la contaminación por especies mejor adaptadas, diferentes a la que se pretende cultivar. Como resultado, estos cultivos externos raramente se pueden mantener más de unas pocas semanas (De Paw, N. *et al*, 1984. Mass culture of microalgae in aquaculture systems, progress and constraints. *Hidrobiologia*, **116/117**: 121-134).

Debido a estos problemas, desde hace relativamente poco tiempo, se están desarrollando fotobiorreactores cerrados, tanto planos (Tredice, M.R. *et al*, 1988. Impianto perfezionato per la coltura in strato laminare sottile dei microorganismi fotosintetici. *Brevetto d'invenzione n° 9357 A/88-CNR*; Pulz, O., 1992. Cultivation techniques for microalgae in open and closed systems. *Proceedings of Algology*, 1st European Workshop on Microalgal Biotechnology: 61-66) como tubulares (Pirt, S.J. *et al*, 1983. A tubular bioreactor for photosynthetic production of biomass from carbon dioxide: design and performance. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **33B**: 35-58; Gudín, C. y Therpenier, C., 1986. Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae. En A. Mizrabi y A.L. van Wezel (Eds) *Advances in Biotechnological Processes*, Vol. 6. Alan R. Liss, New York, N.Y.: 73-110; James, C.M. y Al-Khars, A.M., 1990. An intensive continuous culture system using tubular photobioreactors for producing microalgae. *Aquaculture*, **87**: 381-393).

La mayoría de estos sistemas tienen el inconveniente de un coste muy elevado o limitaciones técnicas importantes, o ambos. Los reactores planos muestran deficiencias en el control de flujo del cultivo. Los tubulares horizontales están muy limitados por la acumulación de oxígeno, entre otros problemas (Weissman, J.C. *et al*, 1988.

Photobioreactor design: mixing, carbon utilization and oxygen accumulation. *Biotechnol. Bioeng.*, **31**: 336-344), mientras que los tubulares verticales tienen también problemas de control de flujo (Chisti, M.Y., 1983. Airlift bioreactors. Elsevier Science Publishers LTD, New York, N.Y.) y limitación por luz.

También se utilizan actualmente fotobiorreactores tipo tanque agitado, principalmente cuando se persigue la obtención de productos químicos de alto valor añadido sintetizados por microorganismos fotosintéticos (Semenenko, V.E. *et al*, 1992. Closed type photobioreactor. *Proceedings of Algology*, 1st European Workshop on Microalgal Biotechnology: 67-70). Pero el tanque agitado no es el mejor diseño para el cultivo de microorganismos, por diferentes razones, entre las que cabe señalar (Royse, S., 1987. Scaling up for mammalian cell culture. *The Chemical Engineer*, **Noviembre**: 12-13) que el grado de agitación necesario para alcanzar suficiente transferencia de anhídrido carbónico y una frecuencia de exposición a la luz razonable hace que se produzcan, en muchos casos, daños al microorganismo al pasar por la zona donde se encuentra el agitador. Además, la energía mecánica necesaria para alcanzar la transferencia de materia suficiente, es grande, lo que implica costes elevados y, puesto que esta energía mecánica es disipada en el fluido en forma de calor, éste debe retirarse después, lo que aumenta los costes de refrigeración.

Una vez cosechada la biomasa (preferentemente por centrifugación o microfiltración) son diversos los métodos que se pueden utilizar para obtener concentrados de ácidos grasos poliinsaturados con altos contenidos en eicosapentaenoico. Generalmente, todos están basados en una combinación de técnicas como saponificación, extracción con disolventes, inclusión de urea, destilación molecular, destilación fraccionada, cromatografía líquida y extracción supercrítica (Fujita, T. y Makuta, M., 1983. Method of purifying eicosapentaenoic acid and its esters. U.S. patent, 4377526).

### Descripción de la invención

La invención se refiere a un fotobiorreactor airlift modular, de recirculación interna, en material plástico transparente, constituido por cinco módulos independientes: un cuerpo central, un desgasificador, una tapa inferior y dos módulos de unión, uno entre el cuerpo central y el desgasificador y otro entre el cuerpo central y la tapa inferior. Cada uno de estos módulos es reemplazable de forma independiente, lo que permite variar la configuración del dispositivo en poco tiempo y a bajo costo.

El sistema incorpora un dispositivo de monitorización y control de pH con compensación automática de temperatura. El controlador activa una válvula solenoide colocada en una línea presurizada de anhídrido carbónico cuando el pH del cultivo excede un valor prefijado.

El anhídrido carbónico es introducido en el cultivo mezclado con el aire, que se suministra de forma continua, procedente de un compresor, a través de un burbujeador colocado en la base del cuerpo central.

El dispositivo incorpora también un sistema

de monitorización del oxígeno disuelto.

El suministro del medio de cultivo se efectúa mediante una bomba peristáltica en la parte inferior del cuerpo central, junto a la entrada del gas.

La salida del cultivo, en funcionamiento continuo, se efectúa a través de un rebosadero situado en el desgasificador.

El control de la temperatura se realiza mediante un cambiador de calor de vidrio, de tamaño apropiado, colocado verticalmente en el cuerpo central, por el que circula agua procedente de una unidad de refrigeración, impulsada por una bomba centrífuga.

El dispositivo hace hincapié en tres de los factores mencionados en el estado de la técnica como decisivos para la acumulación de ácidos grasos poliinsaturados en las microalgas: la intensidad de iluminación, la aireación y la temperatura.

De los otros dos factores mencionados, la composición del medio de cultivo dependerá de la especie de microalga utilizada, puesto que cada especie tendrá unos requerimientos nutricionales diferentes. La edad del cultivo en el cosechado es, evidentemente, un factor controlable cualquiera que sea el dispositivo de cultivo utilizado.

Al ser el fotobiorreactor utilizado del tipo *air-lift* con recirculación interna, se mejora la exposición del cultivo a la luz puesto que la capa de cultivo expuesta a la zona mejor iluminada tiene un espesor muy pequeño y se renueva constantemente.

El dispositivo mejora la transferencia de materia, tanto de los reactores tubulares como los reactores tanque agitado, evitando los problemas de acumulación de oxígeno que se presentan en los reactores tubulares horizontales, puesto que el oxígeno generado por la fotosíntesis es eliminado de forma instantánea; mejorando, al mismo tiempo, el suministro de anhídrido carbónico, y retrasando así la limitación por éste.

El dispositivo evita las dificultades de control de flujo que presentan los reactores planos y tubulares verticales.

El dispositivo evita los problemas que se presentan en el control de temperatura, tanto en reactores planos como tubulares horizontales, debido a los altos coeficientes de transmisión de calor obtenidos con el sistema de refrigeración utilizado, con la consiguiente mejora en la estabilidad térmica de los cultivos.

El dispositivo evita el estrés mecánico que sufren las microalgas en el reactor tanque agitado, al no disponer de partes móviles.

Todas estas mejoras unidas, conducen a que se consigan fases exponenciales de crecimiento de mayor duración, reduciendo el tiempo de cultivo y aumentando la productividad.

En la figura 1 se puede ver un esquema general de la instalación.

El medio de cultivo estéril es introducido en el fotobiorreactor (101) mediante una bomba peristáltica (102) por la entrada (103) situada en la base, junto al burbujeador (104), con lo que se consigue una mezcla prácticamente inmediata con el cultivo. Para evitar problemas de retroceso del cultivo debido a la presión hidrostática, entre la entrada (103) y la bomba peristáltica (102) se

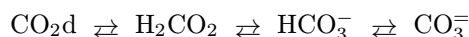
ha colocado una válvula antirretorno (105).

El cultivo es iluminado con 10 lámparas fluorescentes (106) (*General Electric de luz día, modelo F-40-LD*) que proporcionan una intensidad de iluminación entre 50 y 500 w/m<sup>2</sup> en la superficie del fotobiorreactor (101), permitiendo la posibilidad de trabajar con diferentes intensidades de iluminación continua o en ciclos luz-obscuridad mediante la colocación de un temporizador, que conecta y desconecta la iluminación. No se descarta la utilización de iluminación solar si se elige una ubicación exterior para el dispositivo.

Al cultivo se le suministra aire procedente de un compresor (107) a través de un burbujeador (104) de vidrio poroso, con un tamaño de poro entre 40 y 90 micras, de forma cilíndrica, aunque no se excluye la posibilidad de utilizar burbujeadores de forma, porosidad y material diferentes.

El caudal de aire suministrado, medido en un flotámetro (108), puede variar entre 0 y 30 litros por minuto, influyendo éste no solo en la transferencia de materia (cantidad de oxígeno y anhídrido carbónico disponibles para las microalgas) sino también, en la velocidad de circulación, y por consiguiente en la frecuencia de exposición a la luz y en el estrés hidrodinámico al que están sometidas las microalgas.

Una vez que ha comenzado el cultivo, el anhídrido carbónico (suministrado con el aire) disuelto, CO<sub>2</sub>d, que es el responsable del aporte de carbono a las microalgas, está sometido a los siguientes equilibrios químicos



La presencia de este anhídrido carbónico en el medio de cultivo debería, normalmente, implicar una acidificación del medio. Pero debido a que las microalgas consumen rápidamente el anhídrido carbónico (la cinética de la reacción fotosintética es como mucho igual a 1 segundo) los equilibrios químicos anteriores tienden a desplazarse a la derecha, lo que implica una alcalinización del medio de cultivo; por lo que se hace necesario controlar el pH con la adición de un ácido. Para este control el fotobiorreactor dispone de un electrodo combinado de pH (109) (*Ingold, modelo 405-DPAS-K8S/120*) conectado a un medidor-controlador con compensación automática de temperatura (110) (*Crison, modelo pH Rocon 18*).

Cuando el pH del cultivo excede del valor prefijado, que debe ser el pH óptimo para la microalga utilizada, el controlador actúa sobre un relé que cierra el circuito de conexión de una electroválvula (111), abriendo paso a un ácido hasta el cultivo. En el sistema descrito, el ácido utilizado ha sido CO<sub>2</sub> procedente de una bala de alta presión (112); aunque no se excluye la utilización de otros ácidos, como ácido fosfórico o ácido clorhídrico en disoluciones diluidas.

Para seguir el nivel de actividad fotosintética, se mide el oxígeno disuelto en el cultivo por medio de un electrodo de oxígeno (113) (*Ingold, modelo 02-sensor-12/120*) colocado en el cultivo. El valor del oxígeno disuelto se monitoriza de forma continua en un medidor amplificador (114) (*Ingold, modelo 170 ppm O<sub>2</sub>*).

El control de la temperatura se realiza mediante un cambiador de calor (115) formado por tubos de vidrio colocados verticalmente en el interior del fotobiorreactor, aunque no se excluye la posibilidad de utilización de un cambiador de serpentín colocado en el desgasificador o una camisa de termostatación en el exterior del cuerpo central.

El agua de refrigeración pasa, antes de entrar en el cambiador, por un condensador (116) colocado en la parte alta del fotobiorreactor, para condensar el agua evaporada y así, minimizar las pérdidas de agua por evaporación en el sistema.

El agua de refrigeración proviene de un baño termostataizado (117) donde se consigue la temperatura adecuada mediante un refrigerador (118) (SBS, modelo VR-1) y un calefactor con control de temperatura (119) (*Selecta, modelo Frigeterm*), y es impulsada con el caudal apropiado hacia el cambiador por una bomba centrífuga (120).

La temperatura del cultivo se mide de forma continua con una sonda de temperatura PT-100 (121) y es monitorizada en el medidor - controlador de pH (110).

Cuando el sistema funciona en continuo, el volumen de cultivo se mantiene constante en el valor elegido mediante un rebosadero de altura variable (122) colocado en el desgasificador, por medio del cual se realiza el cosechado de cultivo. En funcionamiento discontinuo, el rebosadero está colocado en su posición más baja, utilizándose para la toma de muestras.

En la figura 2 se representa el fotobiorreactor con sus partes fundamentales. El cuerpo central (201), tiene una altura de 1400 mm, con un diámetro interno de 92 mm para el tubo exterior y 65 mm para el tubo interior; el desgasificador (202), tiene una altura de 500 mm y un diámetro de 400 mm; la tapa inferior (203), los módulos de unión (204) y (205), de 150 y 100 mm respectivamente y la tapa del desgasificador (206). El material empleado para la construcción de los módulos ha sido plexíglas para el cuerpo central y los módulos de unión, y metacrilato para los restantes módulos. Todos los módulos van unidos entre sí mediante ocho tornillos, e intercalando entre ellos una junta plana de caucho (207), para conseguir estanqueidad. El volumen útil que se obtiene con esta configuración varía entre 10 litros y 40 litros.

En la figura 3 se muestra el detalle del modo de unión de los tubos que componen el cuerpo central.

En la figura 4 se puede ver la colocación de la entrada de medio para llenar el fotobiorreactor y para el suministro en funcionamiento continuo.

En la figura 5 se ha representado el desgasificador. En ella se puede ver el rebosadero (501) utilizado para la toma de muestras y el cosechado; las entradas para los electrodos de pH y O<sub>2</sub> y la sonda de temperatura (502); la entrada y salida del agua de refrigeración (503); la tapa del desgasificador (504) con su sistema de fijación y la colocación del condensador (505).

En la figura 6 se puede ver un corte esquemático de la tapa inferior, que se ha modelado para que su forma favorezca el flujo y evitar las zonas muertas. Se ha incluido también la salida

de desagüe (601) y el burbujeador (602), que se puede reemplazar aflojando la tuerca (603).

En la figura 7 se muestra la colocación del sistema de intercambio de calor utilizado, formado por 8 metros de tubo de vidrio de 10 mm de diámetro interno y en la figura 8 se muestran dos sistemas alternativos: la colocación de un serpentín en el desgasificador y una camisa de termostatación colocada en el cuerpo central.

Ejemplo

Se ha realizado el cultivo de la microalga *Phaeodactylum tricorutum* en el medio de cultivo descrito por Mann y Myers (Mann, J.E. y J. Myers, 1968. On pigments, growth, and photosynthesis of *Phaeodactylum tricorutum*. *J. Phycol.* 4. 349-355), cuya composición es:

| Componente                           | Concentración (g/l) |
|--------------------------------------|---------------------|
| NaCl                                 | 5,00                |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 1,20                |
| NaNO <sub>3</sub>                    | 1,00                |
| KCl                                  | 0,60                |
| CaCl <sub>2</sub>                    | 0,30                |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 0,10                |
| TRIS                                 | 1,00                |

Disolución de Micronutrientes  
(Se adicionan 10 ml por litro de cultivo)

|  |        |
|--|--------|
| Na <sub>2</sub> EDTA                                 | 3,00   |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 0,60   |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                 | 0,20   |
| MnCl <sub>2</sub>                                    | 0,14   |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                 | 0,033  |
| Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O | 0,0007 |
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O                 | 0,0002 |

El volumen de cultivo fue de 15 litros. El pH se ha mantenido constante en un valor de 7.7 por adición de anhídrido carbónico, y la temperatura en 20°C. La iluminación en la superficie del fotobiorreactor ha sido constante, de 350 w/m<sup>2</sup>. El caudal de aire, de 0.8 volúmenes de aire por volumen de cultivo y minuto.

Fueron necesarios alrededor de 14 días para que el cultivo alcanzara la fase estacionaria.

La concentración celular se determinó por espectrofotometría, es decir, en función de la densidad óptica del cultivo, a 625 nm, que corresponde al máximo de absorción de *Phaeodactylum tricorutum*.

Cuando el cultivo alcanzó la fase estacionaria, se cosechó la biomasa y se analizó su contenido en ácidos grasos por cromatografía gaseosa.

La figura 9 muestra la curva de crecimiento obtenida, variación del logaritmo de la concentración adimensional de biomasa en función del tiempo de cultivo.

Se observa en esta figura, que tras una fase de adaptación, aparece una fase exponencial, donde la microalga crece a su máxima velocidad, que se extiende hasta concentraciones de biomasa por encima de 3 g/l.

El contenido en ácidos grasos totales fue del 10% sobre biomasa seca, de los cuales, el 30% eran ácidos grasos poliinsaturados.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

En la figura 10 se puede ver la distribución de estos ácidos grasos poliinsaturados, donde destaca el eicosapentaenoico con un 72,42% del total de poliinsaturados, lo que corresponde a un 22% sobre ácidos grasos totales.

La productividad alcanzada para el ácido eicosapentaenoico fue, al final de la fase exponencial de 21 mg por litro de cultivo y día.

## REIVINDICACIONES

1. Dispositivo para el cultivo de microorganismos fotosintéticos y la producción de biomasa rica en ácido eicosapentaenoico **caracterizado** por ser del tipo *airlift* con recirculación interna, modular, en material plástico transparente y posibilidad de funcionamiento continuo, discontinuo o semicontinuo.

2. Dispositivo para el cultivo de microorganismos fotosintéticos y la producción de biomasa rica en ácido eicosapentaenoico, según la reivindicación 1 **caracterizado** porque los módulos que lo componen son independientes y pueden ser cambiados o modificados de forma independiente para variar la estructura del dispositivo.

3. Dispositivo para el cultivo de microorganismos fotosintéticos y la producción de biomasa rica en ácido eicosapentaenoico, según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque la luz necesaria para el crecimiento del microorganismo es suministrada por lámparas fluorescentes de luz día, con intensidades entre 50 y 500 w/m<sup>2</sup> y posibilidad de iluminación continua o cíclica.

4. Dispositivo para el cultivo de microorganismos fotosintéticos y la producción de biomasa rica en ácido eicosapentaenoico, según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque la luz necesaria para el crecimiento del microorganismo puede ser suministrada por el sol.

5. Dispositivo para el cultivo de microorganismos fotosintéticos y la producción de biomasa rica en ácido eicosapentaenoico, según las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque el control de la temperatura del cultivo se realiza mediante un cambiador de calor formado por tubos de vidrio colocados verticalmente en el interior del fotobiorreactor, por el que circula agua a la temperatura adecuada procedente de un baño termostatzado.

6. Dispositivo para el cultivo de microorganismos fotosintéticos y la producción de biomasa rica en ácido eicosapentaenoico, según las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque el control

de la temperatura del cultivo se puede realizar mediante un serpentín de vidrio colocado en el interior del desgasificador.

7. Dispositivo para el cultivo de microorganismos fotosintéticos y la producción de biomasa rica en ácido eicosapentaenoico, según las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque el control de la temperatura del cultivo se puede realizar mediante una camisa de termostatzación que envuelva el módulo central del fotobiorreactor.

8. Dispositivo para el cultivo de microorganismos fotosintéticos y la producción de biomasa rica en ácido eicosapentaenoico, según las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque el control del pH del cultivo se realiza por adición de anhídrido carbónico mediante un sistema de control con compensación automática de la temperatura.

9. Dispositivo para el cultivo de microorganismos fotosintéticos y la producción de biomasa rica en ácido eicosapentaenoico, según las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque incluye un sistema de medida continua del oxígeno disuelto en el cultivo.

10. Dispositivo para el cultivo de microorganismos fotosintéticos y la producción de biomasa rica en ácido eicosapentaenoico, según las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** porque el aire se suministra a través de un burbujeador de vidrio poroso de forma cilíndrica.

11. Dispositivo para el cultivo de microorganismos fotosintéticos y la producción de biomasa rica en ácido eicosapentaenoico, según las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque todo o parte del carbono necesario para el crecimiento del microorganismo es suministrado mediante burbujeo de aire y anhídrido carbónico puro.

12. Dispositivo para el cultivo de microorganismos fotosintéticos y la producción de biomasa rica en ácido eicosapentaenoico **caracterizado** como se describe y representa de forma esquemática en las figuras 1 a 8.

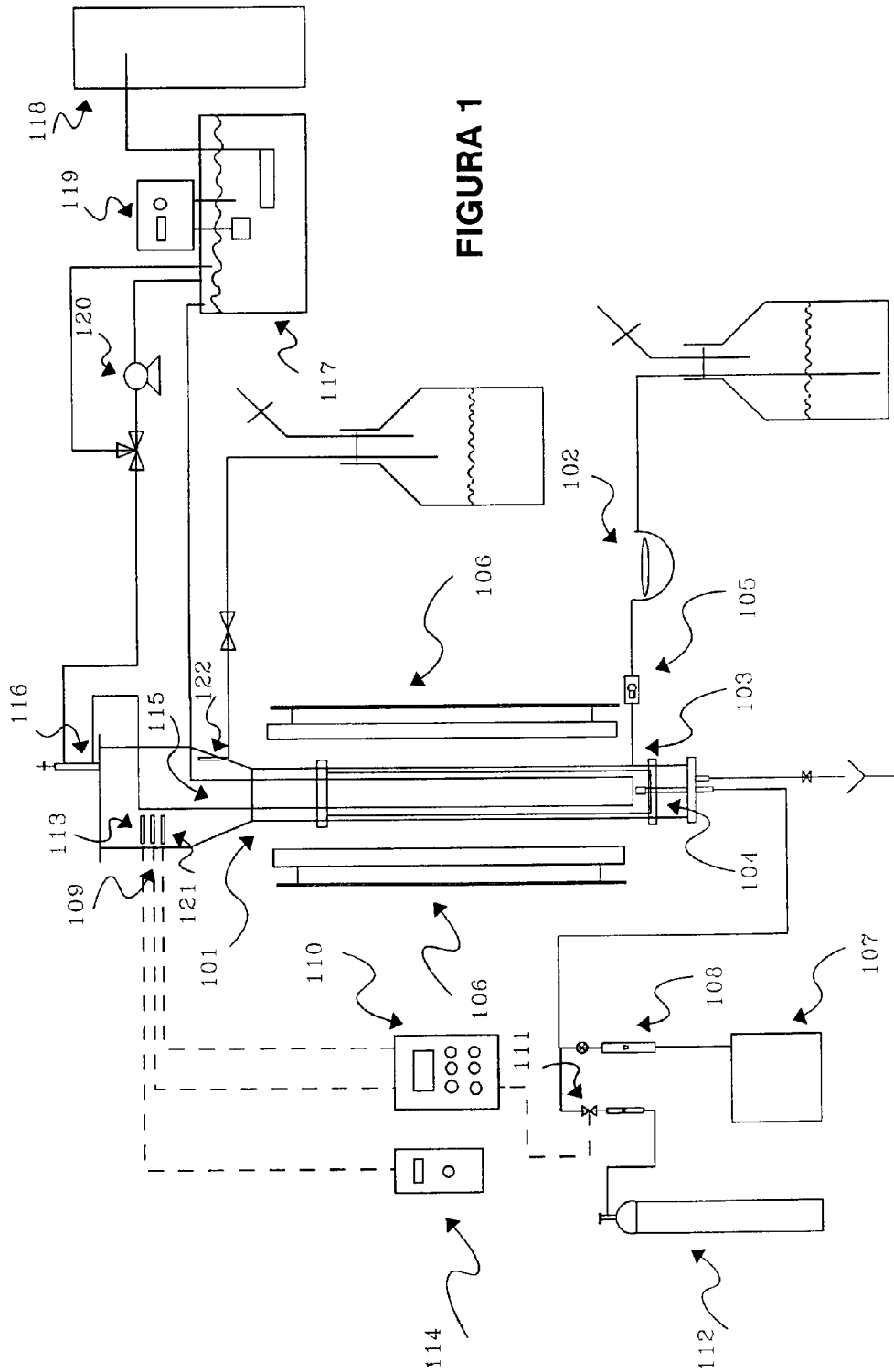
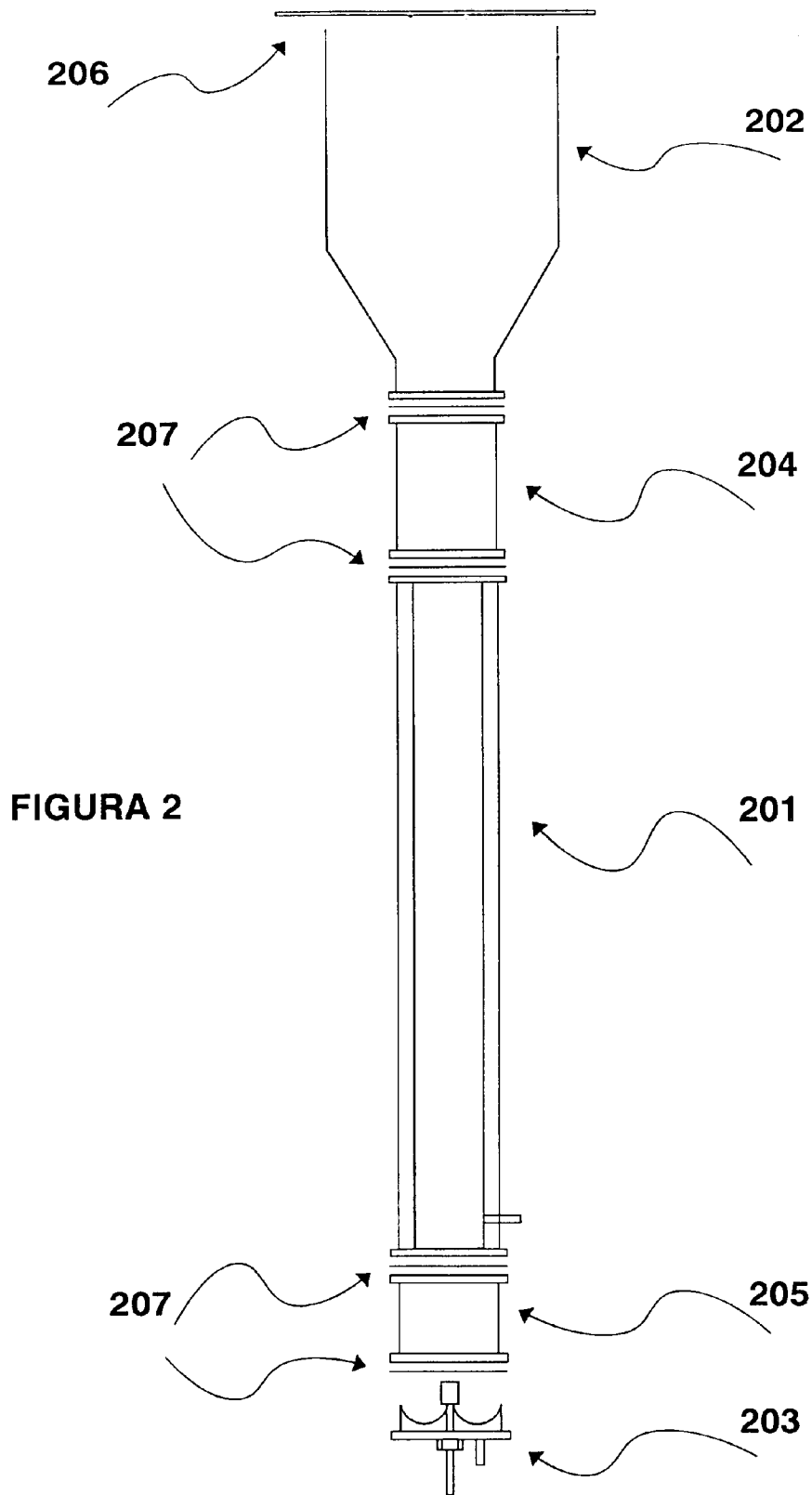
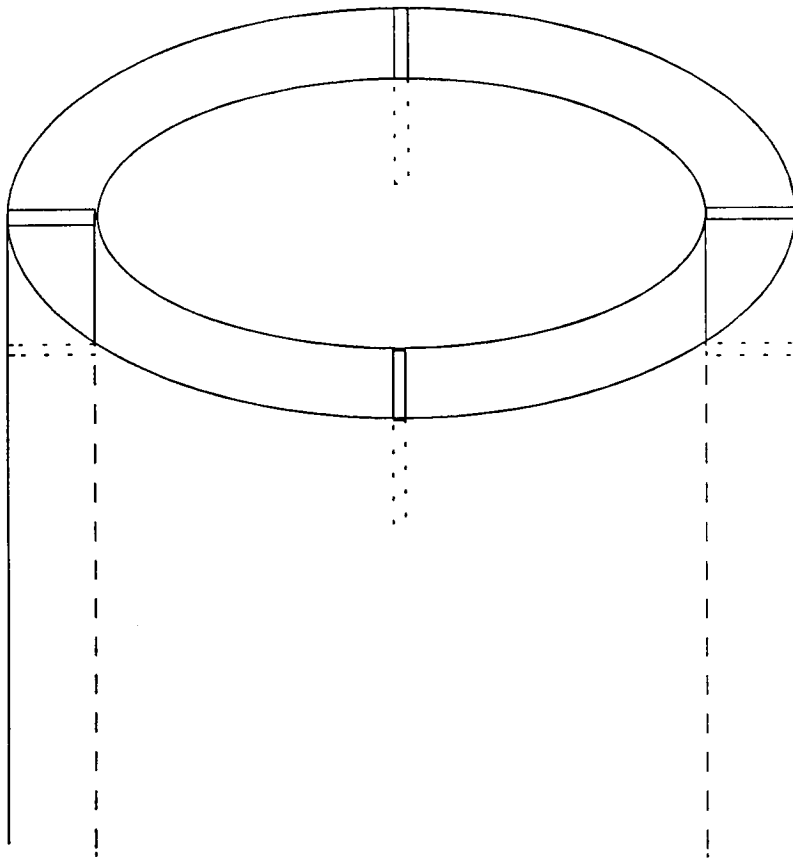


FIGURA 1





**FIGURA 3**



**FIGURA 4**

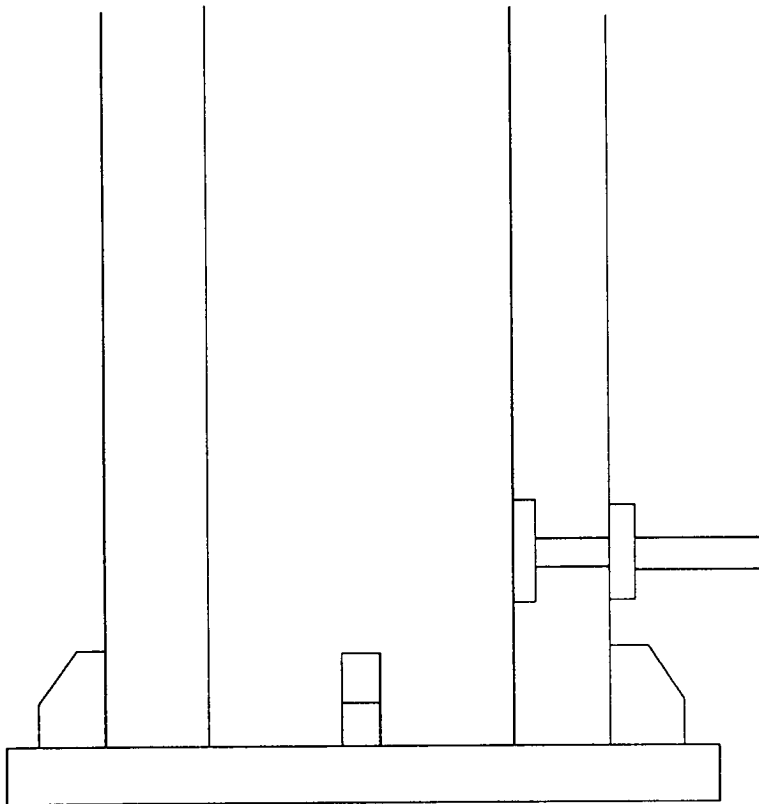
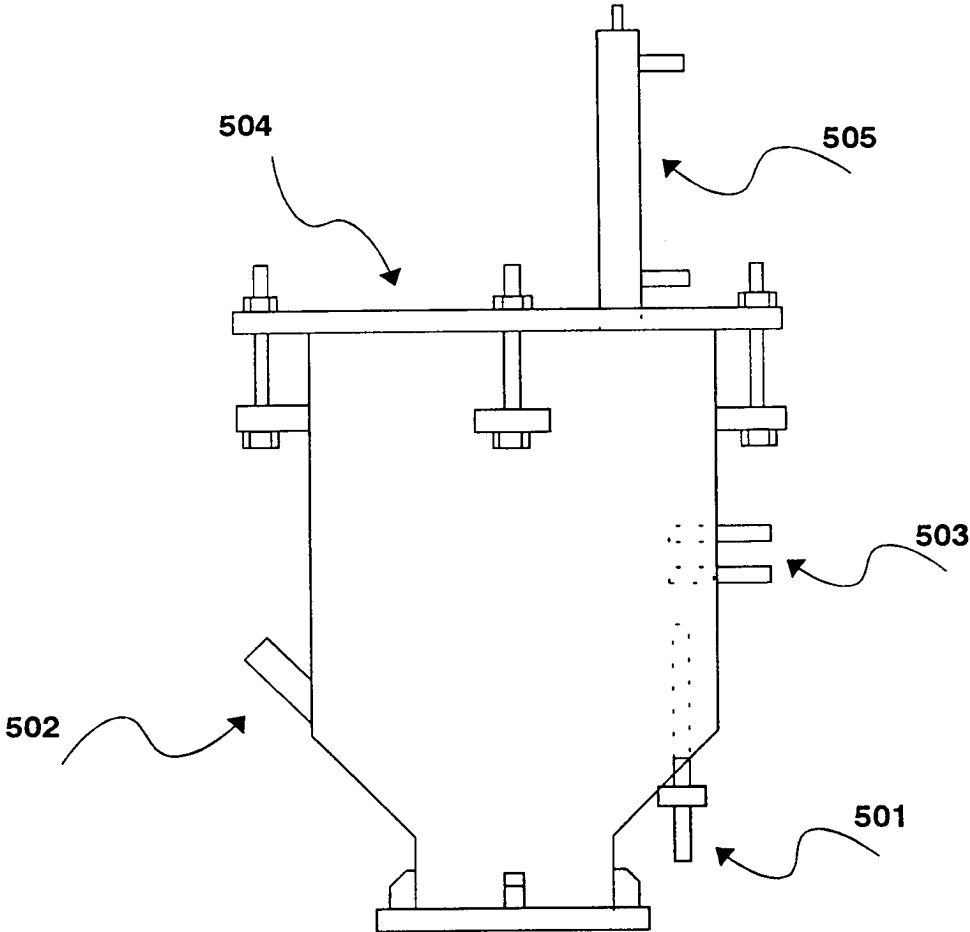
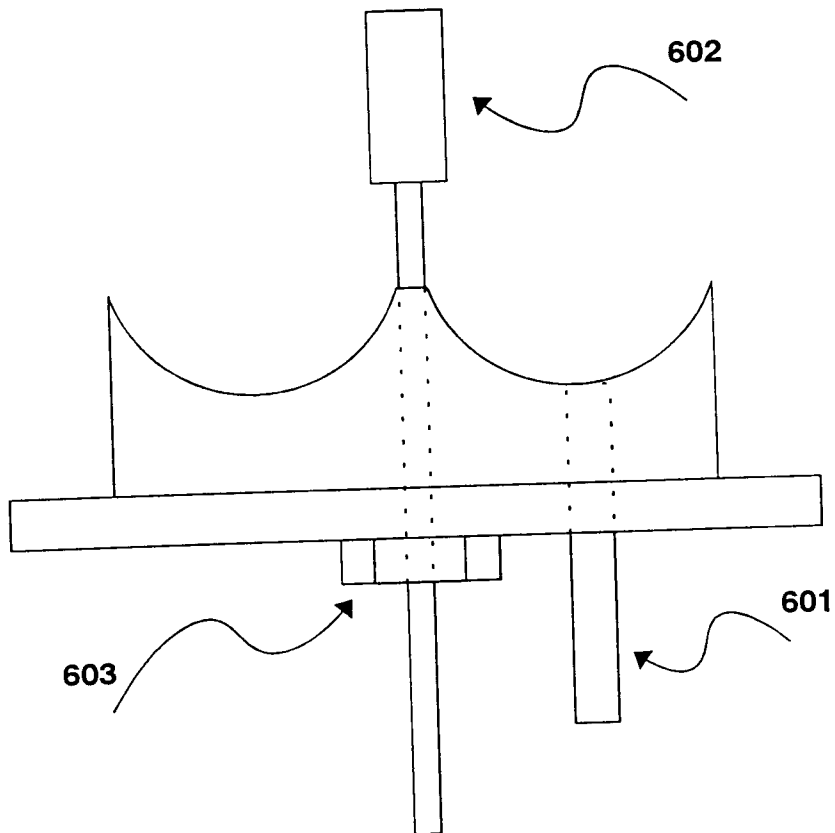


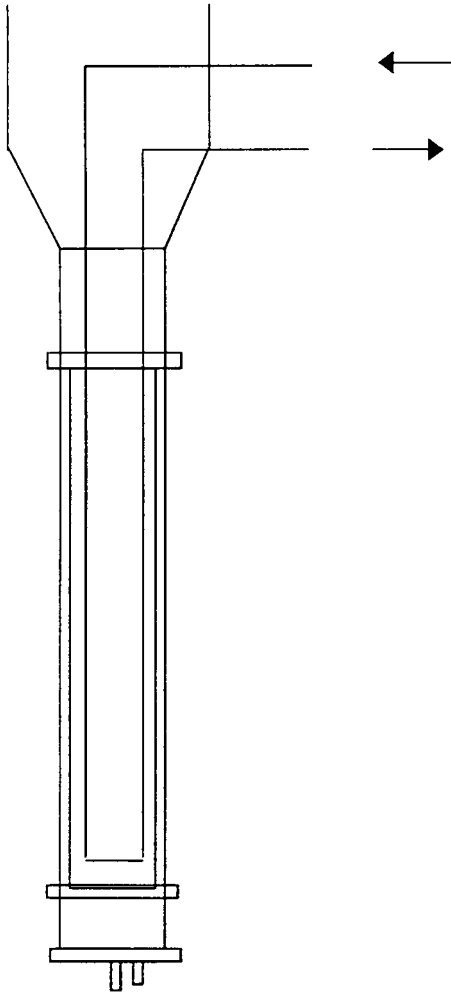
FIGURA 5



**FIGURA 6**



**FIGURA 7**



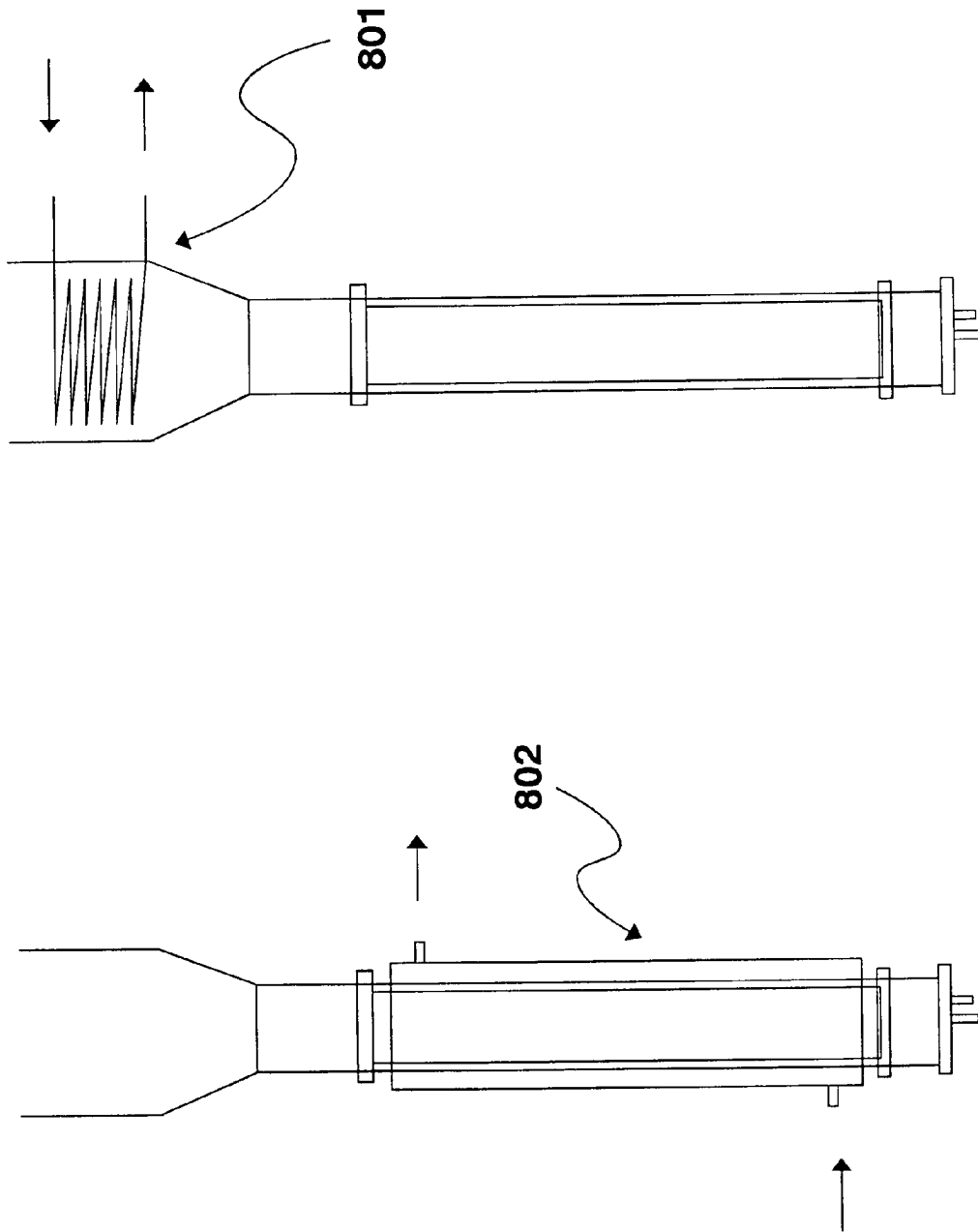
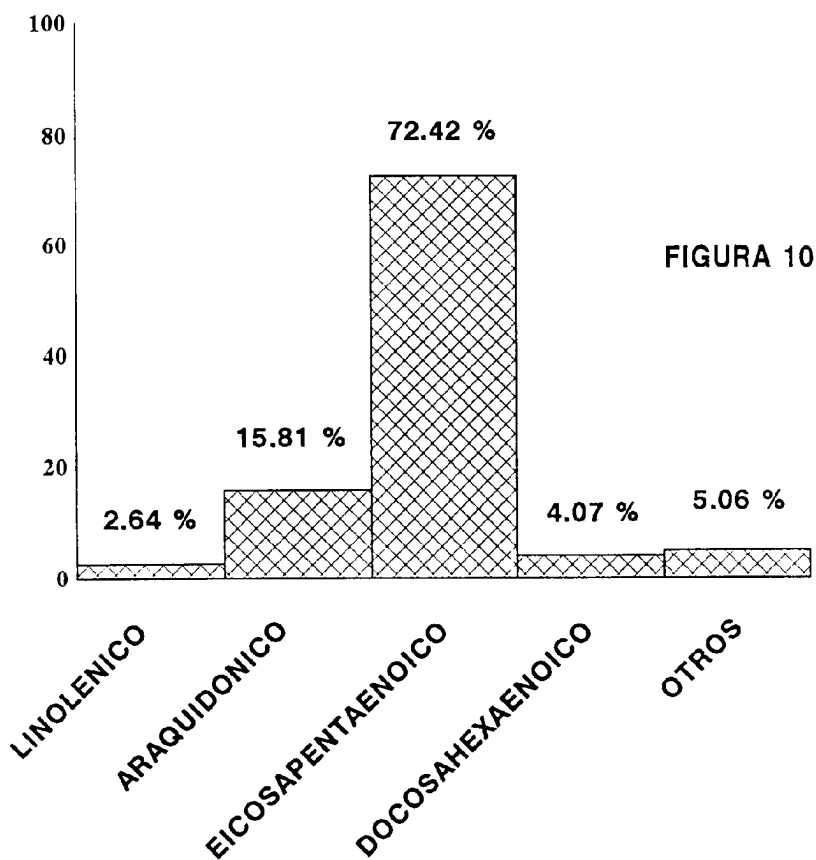
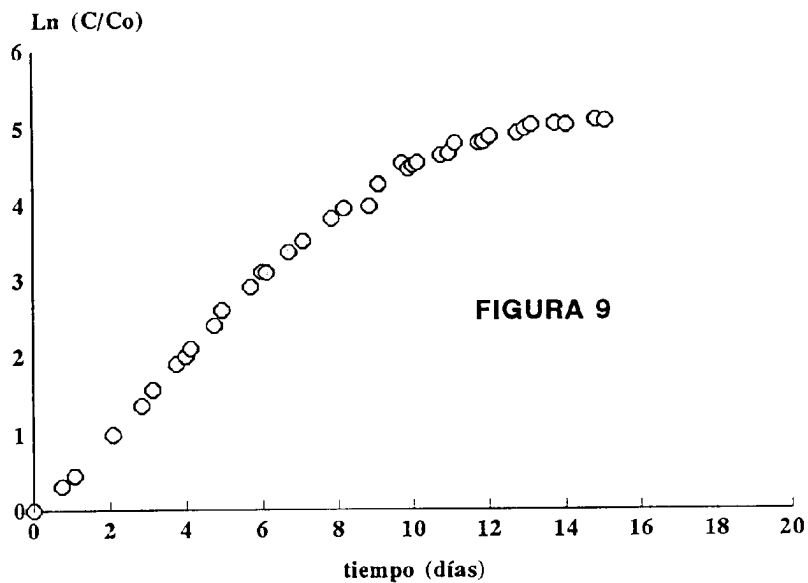


FIGURA 8







INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.<sup>6</sup>: C12M3/00 // (C12M3/00, C12R1:89)

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados  | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| A         | ES-8403329-A (JOSEF HUBERT SCHICK) 16.03.84<br>*Todo el documento*            | 1-11                       |
| A         | GB-2118572-A (QUEEN ELIZABETH COLLEGE) 2 Nov 1983<br>*Todo el documento*      | 1-11                       |
| A         | GB-2235210-A (THE WEST OF SCOTLAND COLLEGE) 27.02.1991<br>*Todo el documento* | 1-11                       |

**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 n.º:

**Fecha de realización del informe**  
11.04.95

**Examinador**  
J.L. Vizán Arroyo

**Página**  
1/1