

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 983 647**

51 Int. Cl.:

C12N 1/12 (2006.01)

C12R 1/89 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.01.2021 PCT/IB2021/050512**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.07.2021 WO21149011**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2021 E 21711633 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2024 EP 4093849**

54 Título: **Cepa de algas rojas unicelulares, método para obtener algas rojas unicelulares y uso de la cepa para la biorremediación y para la preparación de biocombustibles**

30 Prioridad:

24.01.2020 PL 43268420

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

24.10.2024

73 Titular/es:

**UNIWERSYTET WARSZAWSKI (100.0%)
ul. Krakowskie Przedmiescie 26/28
00-927 Warszawa, PL**

72 Inventor/es:

**BOROWSKA, EWA;
ABRAM, MATEUSZ y
KARGUL, JOANNA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 983 647 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

Cepa de algas rojas unicelulares, método para obtener algas rojas unicelulares y uso de la cepa para la biorremediación y para la preparación de biocombustibles

Campo técnico

- 5 El objeto de la invención es una cepa novedosa de un alga roja unicelular *Cyanidioschyzon merolae*.

La invención también se refiere al uso de la cepa según la invención para la biorremediación y para la preparación de biocombustibles.

Antecedentes de la técnica

- 10 Un ambiente ácido, es decir, con un pH bajo, puede producirse de forma natural o ser el resultado de la actividad humana. No es raro que las condiciones ácidas producidas por el ser humano vayan acompañadas de una grave contaminación ambiental (por ejemplo, las salidas ácidas de minas se consideran uno de los mayores peligros ambientales). Una de las posibilidades de reducir el daño ambiental es usar microorganismos en los procesos de biorremediación y procesar los residuos dañinos. Sin embargo, dichos microorganismos deben poder crecer en condiciones con un pH bajo.

- 15 Los microorganismos para los que el pH óptimo para el crecimiento está por debajo de 3 se denominan acidófilos. La mayoría de las especies acidófilas conocidas pertenecen a bacterias o arqueas. El pH bajo del entorno externo obliga a mantener un gradiente de pH alto a través de la membrana celular. Se han descrito varios aspectos de adaptación de las células microbianas a dichas condiciones, tales como sistemas de canales transmembranarios y bombas responsables del transporte activo de cationes de potasio, membranas celulares con baja permeabilidad, síntesis aumentada de ácidos orgánicos, variantes de enzimas, que son estables a pH bajo, así como la presencia de mayores cantidades de chaperonas y proteínas reparadoras que permiten reducir el daño a las proteínas y los ácidos nucleicos (véase la reseña en Austin y Dopson, Life in acid: pH homeostasis in acidophiles, Trends in Microbiology, 2007, vol. 15, número 4). Sin embargo, todavía no se conocen completamente los mecanismos responsables de la supervivencia y el crecimiento de las células a alta acidez, lo que constituye un serio obstáculo a la hora de diseñar, modificar o crear nuevas cepas útiles desde el punto de vista biotecnológico con métodos de genomanipulación (Gumulya *et al.*, In a Quest for Engineering Acidophiles for Biomining Applications: Challenges and Opportunities, Genes, 2018, 9, 116). Entre otras, estrategias para la modificación de bacterias acidolácticas o *E. coli* orientadas a la sobreexpresión de chaperonas, la introducción de vías metabólicas exógenas (por ejemplo, biosíntesis de trehalosa) o el mantenimiento de la funcionalidad de la membrana celular en condiciones de pH bajo (Wu, C.; Huang, J.; Zhou, R. Progress in engineering acid stress resistance of lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014, 98, 1055-1063; Carvalho, A.L.; Cardoso, F.S.; Bohn, A.; Neves, A.R.; Santos, H. Engineering trehalose synthesis in Lactococcus lactis for improved stress tolerance. Appl. Environ. Microbiol. 2011, 77, 4189-4199.). También se conocen estrategias de cultivo adaptativo, que implican una serie de pases de cultivo para obtener cepas adaptadas a las condiciones deseadas (por ejemplo, Ai, C.B.; McCarthy, S.; Eckrich, V.; Rudrappa, D.; Qiu, G.Z.; Blum, P. Increased acid resistance of the archaeon, Metallosphaera sedula by adaptive laboratory evolution. J. Ind. Microbiol. Biot. 2016, 43, 1455-1465), sin embargo, el proceso es muy lento y puede tardar varios años (McCarthy, S.; Johnson, T.; Pavlik, B.J.; Payne, S.; Schackwitz, W.; Martin, J.; Lipzen, A.; Keffeler, E.; Blum, P. Expanding the limits of thermoacidophily in the archaeon Sulfolobus solfataricus by adaptive evolution. Appl. Environ. Microbiol. 2016, 82, 857-867). Para acelerarlo, se ha usado la mutagénesis inducida por, por ejemplo, radiación UV.

- 40 Para la purificación del agua de contaminantes, tales como metales pesados, se ha propuesto en la técnica el uso de microalgas. Muchas especies están adaptadas para capturar iones metálicos del entorno, y se ha postulado su uso en la purificación del agua como una etapa complementaria a la purificación con métodos fisicoquímicos (Kaplan, Absorption and adsorption of heavy metals by microalgae, 2013, Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology, 2.^a edición, Richmond y Qiang Hu ed., John Wiley & Sons, Ltd). Dado que con fines de biorremediación es necesario que la cepa mantenga la capacidad de crecer en condiciones difíciles, asociadas con la presencia de metales pesados en altas concentraciones, pH bajo, etc., se ha postulado el uso de microalgas aisladas de entornos con dichas condiciones, por ejemplo, con pH bajo, tales como cepas de algas verdes extremófilas *Coccomyxa melkonianii*, que pueden crecer en un amplio intervalo de pH de 4,0 a 8,0 (Soru *et al.* Behavior of the extremophile green alga Coccomyxa melkonianii SCCA 048 in terms of lipids production and morphology at different pH values, 2019, Extremophiles, 23:79-89). También se indicó la posibilidad de usar microalgas extremófilas en la biosíntesis de productos útiles en la producción de biocombustibles, alimentos, ingredientes para plásticos, etc. (Soru *et al.*, A novel investigation of growth and lipid production of the extremophile microalga Coccomyxa melkonianii SCCA 048 under the effect of different cultivation conditions: Experiments and modelling, 2018, Chemical Engineering Journal, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.12.049>).

- 55 La microalga roja unicelular *Cyanidioschyzon merolae* puede crecer en condiciones extremas (valores de pH bajos y temperaturas de 40 - 56 °C), aunque se ha demostrado que la especie sobrevive a temperaturas de 35 °C en el agua y de 10 °C en el suelo. Se ha descrito la adaptación exitosa de este organismo al crecimiento a temperatura ambiente (25 °C), con una duración de aproximadamente 250 horas; sin embargo, implicó una reestructuración significativa del

aparato fotosintético y una disminución de la masa seca de las células en cultivo (Nikolova *et al.*, Temperature-Induced Remodeling of the Photosynthetic Machinery Tunes Photosynthesis in the Thermophilic Alga *Cyanidioschyzon merolae*, 2017, Plant Physiology, vol. 174, pág. 35-46).

5 Los autores de la presente invención obtuvieron una cepa novedosa de un alga roja unicelular *Cyanidioschyzon merolae*, basada en la cepa NIES-1332, adquirida de la Colección de Cultivos Microbianos del Instituto Nacional de Estudios Ambientales (Tsukuba, Japón), en donde la cepa novedosa de la invención está adaptada a un pH variable y puede crecer eficazmente en condiciones de pH en el intervalo de 2,5 a 5,5 sin un agente tamponante y, cuando se usa un agente tamponante, en el intervalo de pH de 5,5 - 6,7. Se puede cultivar en un intervalo de temperatura de 25 - 65 °C, aunque el intervalo rango óptimo es de 40 - 42 °C. La cepa recién obtenida puede formar biopelículas sobre
10 fibras de algodón, a diferencia de la cepa de control cultivada a pH 2,5. Tiene el potencial de biorremediar la producción de metales pesados y biocombustibles, tanto en forma de suspensión celular como de biopelícula, debido a la alta capacidad de supervivencia de esta especie en un entorno natural rico en metales pesados y metaloides. La adaptación de la cepa de *C. merolae* para el cultivo (tanto en forma de suspensión celular como de biopelícula) a pH neutro aumenta significativamente las posibilidades de aplicación de esta cepa en la biorremediación de metales pesados debido a la sorción aumentada de metales pesados seleccionados a pH elevado (Lee y Saunders 2003, *supra*).

Por tanto, el objeto de la invención es una cepa del alga roja unicelular *Cyanidioschyzon merolae*, depositada el 25 de octubre de 2019, según los requisitos del tratado de Budapest en el Banco Español de Algas, Centro de Biotecnología Marina, Universidad de Las Palmas, Gran Canaria, Muelle de Taliarte s/n, 35214 Telde, España, con el número
20 BEA_IDA_0073B. La viabilidad de la cepa depositada se confirmó el 17 de diciembre de 2019.

También se describe, pero no forma parte de la invención, un método para obtener algas rojas unicelulares, que incluye las etapas de:

- a) precultivo de una cepa acidófila de algas rojas unicelulares en condiciones de pH bajo óptimas para el crecimiento de la cepa;
- 25 b) primer pase a un medio sin agente tamponante con pH aumentado, aumentando el pH de dicho cultivo diluido en un mínimo de 1 unidad, en donde la DO₇₅₀ resultante de dicho cultivo diluido es $\geq 0,3$;
- c) una serie de pases a un medio sin un agente tamponante con pH aumentado, en donde, en cada etapa consecutiva de dilución del cultivo denso con un medio fresco, el aumento del pH de dicho cultivo diluido se mantiene entre 0,8 y 1,5 unidades de pH;
- 30 d) al menos un pase estabilizador del pH con la adición de un agente tamponante, en donde el pH del cultivo aumenta entre 0,3 y 0,8 unidades de pH;
- e) al menos un pase estabilizador del pH con la adición de un agente tamponante a una concentración mayor que en la etapa d), en donde se proporciona un aumento del pH del cultivo de menos de 0,5 unidades de pH.

35 Como resultado del método anterior, se obtiene un cultivo final de algas rojas unicelulares, con pH estable, mayor al pH de la etapa a), que fue óptimo para la cepa de partida acidófila.

También se describe el método anterior en donde, en la etapa b), la relación volumétrica del cultivo diluido al medio fresco sin un agente tamponante con pH aumentado es de 1:4. Para las etapas sucesivas de adaptación de las células a un pH más alto, esta relación depende de la densidad óptica del cultivo donador y afecta al periodo entre pases sucesivos. También es posible realizar etapas de crecimiento más cortas del cultivo entre pases, al tiempo que se proporcionan cambios de pH más bajos entre pases. A pesar del número aumentado de etapas, dicho proceso proporcionará un tiempo similar para adaptar el cultivo al pH diana final.

También se describe el método anterior en donde el pH del cultivo final después de la etapa e) es más alto que ácido.

También se describe el método anterior en donde el pH del cultivo final después de la etapa e) está en el intervalo neutro.

45 Como se entiende en la presente memoria, el pH en el intervalo neutro es un pH en el intervalo por encima de 6,4, pero por debajo de 7,2.

También se describe el método anterior en donde el pH del cultivo final después de la etapa e) es estable y es de $6,7 \pm 0,3$.

También se describe el método anterior en donde el agente tamponante es ácido 2-morfolinoetanosulfónico.

50 También se describe el método anterior en donde, en la etapa d), el agente tamponante usado es ácido 2-morfolinoetanosulfónico a una concentración de 10 mM.

También se describe el método anterior en donde, en la etapa e), el agente tamponante usado es ácido 2-morfolinoetanosulfónico a una concentración de 20 mM.

También se describe, pero no forma parte de la invención, una cepa de algas rojas unicelulares obtenida con el método anterior.

5 Preferiblemente, la cepa puede crecer eficazmente en condiciones de pH en el intervalo de 2,5 a 5,5 sin un agente tamponante, y en el intervalo de pH 5,5 a 6,7 cuando se usa un agente tamponante. En la presente solicitud, se pretende que el crecimiento eficaz signifique un aumento en la biomasa y la actividad metabólica, particularmente incluyendo el nivel de producción de lípidos, que no se reduce estadísticamente de manera significativa en comparación con la cepa de partida usada en la etapa a).

10 El objeto de la invención también es el uso de la cepa según la invención para la biorremediación.

En una realización preferida del uso de la cepa para biorremediación según la invención, la biorremediación comprende la eliminación de metales pesados.

En una realización preferida del uso de la cepa para biorremediación según la invención, las aguas residuales o subterráneas se someten a biorremediación.

15 El objeto de la invención también es el uso de la cepa según la invención para producir biocombustibles.

En una realización preferida del uso de la cepa para producir biocombustibles, la cepa produce lípidos, incluyendo, en particular, triacilglicerol.

En una realización preferida del uso de la cepa para producir biocombustibles, la producción de lípidos se estimula mediante rapamicina.

20 La presente invención se refiere a la cepa del alga roja unicelular *Cyanidioschyzon merolae* 10D, depositada el 25 de octubre de 2019 según los requisitos del tratado de Budapest en el Banco Español de Algas, Las Palmas, España, con el número BEA_IDA_0073B. Esta especie en el medio natural se encuentra en aguas termales ácidas a un pH por debajo de 2 y a una temperatura de 42 - 65 °C.

25 Como se indica anteriormente, la cepa novedosa de la invención puede crecer eficazmente, con un agente tamponante, en el intervalo de pH 5,5 - 6,7.

El agente tamponante puede ser cualquier agente tamponante conocido en la técnica, adecuado para el intervalo de pH dado, siempre que no sea citotóxico para las células de la cepa. El experto en la técnica puede comprobar la citotoxicidad del agente tamponante siguiendo métodos convencionales conocidos en la técnica, tales como el análisis de la capacidad de supervivencia y el crecimiento celular en presencia del agente tamponante, y seleccionar un agente tamponante apropiado sin experimentación excesiva. Un ejemplo de un agente tamponante preferido puede ser el tampón MES (basado en ácido 2-morfolinoetanosulfónico). Otro agente tamponante ejemplar podría ser, por ejemplo, Bis-Tris como agente tamponante eficaz en el intervalo de pH de 5,8 - 7,2.

30

Una ventaja de la cepa según la invención son las posibilidades de usar técnicas para la manipulación y el análisis del genoma y el transcriptoma para el organismo *C. merolae*, que hasta ahora se ha visto obstaculizado significativamente debido a un pH demasiado bajo. En las condiciones de cultivo utilizadas de pH bajo (pH 2,5 para el cultivo de laboratorio convencional de *C. merolae*) el ADN y el ARNm se hidrolizan, lo que obliga a usar etapas adicionales de preparación del material, reduce la eficiencia del proceso, prolonga su duración y aumenta los costes de los métodos moleculares usados. Cuando se usa un pH más alto, las dificultades asociadas con la investigación y la manipulación del ADN y el ARN son insignificantes. Es importante destacar que, al adaptar la cepa desde un intervalo de pH convencional de 2,5 a un pH más alto de 6,7, dicho organismo modelo puede proporcionar una gran cantidad de información valiosa sobre vías metabólicas únicas, que se activan tras la adaptación a los factores de agresión ambiental.

35

40

La cepa recién obtenida de la invención puede formar biopelículas sobre fibras de algodón, a diferencia de la cepa de control cultivada a pH 2,5. Es importante, porque la biorremediación mediante biopelículas en lugar de suspensiones celulares es particularmente eficaz en el tratamiento de aguas subterráneas y suelos contaminados con metales pesados (Arindam Mitra, Suman Mukhopadhyay, Biofilm mediated decontamination of pollutants from the environment, AIMS Bioengineering, 2016, 3(1): 44-59). La presencia de una matriz de biopelícula facilita la precipitación de metales. Además, una biopelícula puede constituir una barrera que limita la salida de contaminantes de un lugar dado, lo que limita su propagación.

45

50 Un aspecto importante de la invención es la posibilidad de usar la cepa novedosa para eliminar metales pesados, fosfatos y nitratos, es decir, en el campo ampliamente entendido de la biorremediación. En la actualidad, las algas verdes tienen una amplia gama de aplicaciones en este campo. Cabe mencionar aquí que los valores de pH y temperatura son algunos de los parámetros más importantes, que determinan la capacidad de las algas de capturar iones de metales pesados del entorno (Lee, Ming-Kuo y Saunders, James. (2003). Effects of pH on Metals Precipitation

and Sorption: Field Bioremediation and Geochemical Modeling Approaches. *Vadose Zone Journal* - VADOSE ZONE J. 2. 177-185. 10.2113/2.2.177). Las publicaciones científicas indican que, cuando se usan valores de pH más altos, así como temperaturas más altas, la biosorción de iones metálicos por parte de las algas es más eficiente, especialmente en el caso de biopelículas. Lo problemático en este caso es el hecho de que el uso de temperaturas por encima de 25 °C para algas verdes provoca su muerte y, en consecuencia, una disminución de las capacidades de sorción y biorremediación en general.

En el caso de la cepa de *C. merolae* estable obtenida de la invención, viable tanto a una temperatura moderadamente alta (42 °C) como a un pH más alto (pH 6,7), la capacidad de la nueva cepa de capturar iones de metales pesados aumenta. La posibilidad de cultivo a un pH más alto permite optimizar la inmovilización de las células en superficies sólidas, así como la manipulación con el objetivo de aumentar la biomasa. La cepa de la invención también se puede emplear en estudios de vías metabólicas y componentes moleculares, que son la base del potencial adaptativo aumentado de otras cepas de algas, usando estrategias de biología molecular (mutagénesis o silenciamiento del ARN). Por ejemplo, puede producirse síntesis de nuevas proteínas que puedan unirse a y/o eliminar metales pesados en células de *C. merolae* adaptadas al crecimiento a un pH más alto. El uso de dichas proteínas en plantas superiores para la desintoxicación selectiva o la acumulación de determinados elementos o compuestos es una perspectiva atractiva (Zeraatkar *et al.* Potential use of algae for heavy metal bioremediation, a critical review. *J Environ Manage.* 1 de octubre de 2016; 181:817-831. doi: 10.1016/j.jenvman.2016.06.059).

La cepa de la invención se puede usar en el denominado estanque de algas de alta velocidad (HRAP), lo que permite una desinfección más eficaz de las aguas residuales, su tratamiento con bajo consumo energético, así como la producción de biocombustibles a partir de la biomasa aumentada de algas obtenida (R Craggs, J Park, S Heubeck y D Sutherland (2014) High rate algal pond systems for low-energy wastewater treatment, nutrient recovery and energy production, *New Zealand Journal of Botany*, 52:1, 60-73, DOI: 10.1080/0028825X.2013.861855).

La cepa de la invención se puede usar para el tratamiento de las salidas de las minas de pH variable, así como de las aguas residuales que contienen azufre de una planta térmica y eléctrica caracterizada por un aumento de la temperatura del agua.

La cepa de la invención se puede usar para eliminar contaminantes biógenos (que contienen compuestos de nitrógeno y fósforo), lo que contribuye a la eutrofización.

Adicionalmente, se realizan estudios sobre el uso de *C. merolae* para una producción eficiente de lípidos para aplicaciones biotecnológicas, tal como la producción de biocombustibles. En general, en condiciones de agresión, las algas producen más lípidos. Hasta ahora, la producción de lípidos en *C. merolae* se examinó únicamente usando condiciones convencionales de cultivos de laboratorio (Mori, N., Moriyama, T. y Sato, N. (2019), Uncommon properties of lipid biosynthesis of isolated plastids in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *FEBS Open Bio*, 9: 114-128. doi:10.1002/2211-5463.12551) y el uso de la manipulación metabólica (uso de rapamicina para inhibir la cinasa TOR con el objetivo de aumentar los niveles de lípidos en el citosol, incluyendo triacilglicerol, en células de *C. merolae*) en condiciones convencionales de cultivo solo fue posible después de utilizar manipulaciones de ingeniería genética costosas y muy lentas (Imamura, S., Kawase, Y., Kobayashi, I. *et al.* *Plant Mol Biol* (2015) 89: 309. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0370-6>).

Los estudios realizados por los autores de la presente invención mediante la medición cuantitativa de los lípidos con un método colorimétrico indican aproximadamente un 16 % de lípidos presentes en la masa seca de una muestra de la cepa de *C. merolae* según la invención, adaptada a pH 6,5. En comparación con el cultivo de *C. merolae* realizado a pH 2,5, el contenido de lípidos en la cepa de la invención es similar. Sin embargo, debido a la adaptación del cultivo de *C. merolae* a un pH más alto, se facilita la utilización de la inhibición de la cinasa TOR mediante rapamicina, lo que es crucial para aumentar la producción de triacilglicerol, que forma gotas de lípidos citoplasmáticos en las células de las microalgas (Imamura *et al.* 2015, *Plant Mol Biol* (2015) 89:309-318 DOI 10.1007/s11103-015-0370-6). La rapamicina se degrada a un pH bajo, por tanto, a un pH aumentado, será posible usar la manipulación metabólica simple descrita anteriormente (inhibición de la cinasa TOR con rapamicina) por primera vez también en una cepa no modificada genéticamente de *C. merolae*, sin la necesidad de las manipulaciones genéticas costosas y muy lentas descritas en Imamura *et al.* (2015).

También se describe, pero no forma parte de la invención, un método para adaptar una cepa a las condiciones de pH más alto (hasta 6,7) en un intervalo de temperatura específico (25 - 45 °C). Los métodos de adaptación incluyen las siguientes etapas: seleccionar células sanas adecuadas para hacer pases, usar un medio apropiado, adaptar las células durante los días consecutivos al pH diana.

El método anterior implica el uso de un cultivo iniciador y aplicar pequeñas etapas de adaptación. La esencia del método anterior es una adaptación lenta de las células a un estímulo de pH cambiante diluyendo el cultivo denso con una pequeña cantidad de medio de cultivo de pH gradualmente creciente (partiendo de la primera etapa de aumento del pH del cultivo hasta 3,5, y luego en cada etapa consecutiva de dilución del cultivo denso con un medio fresco, manteniendo el aumento del pH del cultivo de ± 1 unidad de pH). Es muy importante mantener el cultivo sometido a la adaptación al nuevo pH durante aproximadamente 7 días para permitir una adaptación metabólica eficiente de las células (en ese tiempo se observa un aumento en el número de células y una pequeña disminución en el pH del cultivo

de 0,5 unidades de pH de promedio). El tiempo exacto puede variar dependiendo de las condiciones de cultivo, incluyendo la temperatura, la intensidad de la luz y la concentración de CO₂ en el aire. Por ejemplo, la tasa de crecimiento del cultivo puede aumentarse usando una mezcla de CO₂ al 5 % en el aire o aumentando la intensidad de la luz hasta 90 μE/m²/s; y, a su vez, puede disminuirse cuando se reduce la temperatura del cultivo. El experto en la técnica podrá ajustar las condiciones del cultivo y la duración del pase a las capacidades y necesidades específicas, sin experimentación excesiva. Se pueden realizar diluciones posteriores con aumentos adicionales del pH, por ejemplo, cuando el cultivo alcanza una DO₇₅₀ ~1,0 o mayor. Un método de adaptación sistémicamente gradual es la clave para mantener una alta viabilidad de las células.

Breve descripción de las figuras

10 Figura 1. Curva de crecimiento de suspensión celular de *C. merolae* tras la adaptación a pH >6,0. Adicionalmente, se muestran los cambios de pH durante el cultivo celular de 10 días.

Figura 2. Cultivos en suspensión celular representativos de la cepa estable de *C. merolae* adaptada al crecimiento a pH 6,7.

15 Figura 3. Microfotografía de la cepa estable de *C. merolae* obtenida según la invención en presencia de fibras de algodón. Se indica la biopelícula que se forma sobre las fibras, formada por células de *C. merolae* cultivadas a un pH >6. Se obtuvieron microfotografías a un aumento 40x.

20 Figura 4. Biopelícula formada por las células de la cepa de *C. merolae* novedosa cultivada sobre un sustrato de tela de algodón a pH >6 (izquierda) y biopelícula de la cepa de control de *C. merolae* cultivada al pH convencional de 2,5 (derecha). La densidad de las células de la biopelícula a pH >6 es ~5 veces mayor en comparación con la biopelícula de *C. merolae* a pH 2,5 en el mismo momento analizado de la formación de biopelícula (7 días).

25 Figura 5. Imágenes de microscopía fluorescente de la emisión de clorofila desde las células de *C. merolae* cultivadas a pH 2,5 (control, izquierda) y pH >6 (derecha). Se obtuvieron microfotografías después de la excitación de la clorofila a 580-598 nm usando un microscopio de fluorescencia LS720 (Etaluma) a un aumento 40x. Barra de escala: 50 μM. Ambas microfotografías muestran la fluorescencia de cloroplastos individuales en células de *C. merolae*, lo que demuestra la viabilidad celular en ambos cultivos.

Figura 6. Imágenes de fluorescencia de la emisión de clorofila de cloroplastos individuales presentes en el interior de células de *C. merolae* cultivadas a pH >6, que forman una biopelícula sobre un sustrato de fibra de algodón. Barra de escala: 50 μm. Se obtuvieron microfotografías después de la excitación de la clorofila a 580-598 nm usando un microscopio de fluorescencia LS720 (Etaluma) a un aumento 40x.

30 La figura 7 muestra los resultados obtenidos con espectroscopia de absorción RT de la cepa de control de *C. merolae* (figura 7A) y la cepa novedosa de *C. merolae* adaptada al crecimiento a pH neutro (figura 7C). Para determinar las curvas de crecimiento, se midió la densidad óptica (DO) de los cultivos celulares de ambas cepas a 683 nm (figura 7B) y 750 nm (figura 7D). La figura 7E muestra la relación entre el valor máximo de absorbancia correspondiente a los ficobilisomas (630 nm, PBS) y a los fotosistemas I y II (680 nm, PS) para cada punto temporal de las curvas de crecimiento. Se muestran los valores de media y desviación típica (SD) obtenidos de dos réplicas de 2 muestras biológicas independientes (n = 4).

35 La figura 8 muestra los resultados de la espectroscopia de fluorescencia de 77K de la cepa de control de *C. merolae* (figuras 8A, 8B, 8E, 8F, 8I, 8J) y la cepa novedosa de *C. merolae* adaptada a pH neutro (figuras 8C, 8D, 8G, 8H, 8K, 8L). Las figuras 8A-8H presentan los espectros de emisión después de la excitación de Chl a 435 nm (figura 8A-8D) y la excitación de PBS a 600 nm (figuras 8E-8H). Las figuras 8I-8L muestran los espectros de excitación registrados a 728 nm. Los espectros de las figuras 8A y 8C se normalizan con respecto al pico de emisión de PSI, los espectros de las figuras 8E y 8G se normalizan con respecto al pico de emisión de PSII, mientras que los espectros de las figuras 8I y 8K se normalizan con respecto al pico de emisión de PBS. Las relaciones de los picos de emisión correspondientes a los ficobilisomas (PBS) y a los fotosistemas I (PSI) y II (PSII) se muestran en las figuras 8B, 8D, 8F, 8H, 8J, 8L, respectivamente.

40 La figura 9 muestra las actividades de producción (luz) y consumo (oscuridad) de oxígeno de la cepa novedosa de *C. merolae* en pH neutro. Las células se cultivaron a pH 2,5 (control) o pH 6,8 (pH neutro). Se incubaron las células en una fase de crecimiento logarítmico (DO₆₈₂ de 0,4) en la oscuridad durante 2 min antes de cada medición con un electrodo de tipo Clark. Los datos son valores de media ± SD para 2 réplicas de 2 muestras biológicas independientes (n = 4). La producción de oxígeno se midió con una iluminación de luz blanca de 2000 μE/m²/s.

45 La figura 10 muestra el contenido de lípidos en las células de la cepa novedosa de *C. merolae* en pH neutro. Los datos del contenido total de lípidos por 1 ml de suspensión celular (DO₆₈₂ ~1,0) o por mg de masa fresca para el control y la cepa a pH neutro son valores de media ± SD para 2 réplicas de 2 muestras biológicas independientes (n = 4).

La figura 11 muestra imágenes de microscopía confocal para la cepa de control de *C. merolae* (A) y la cepa novedosa de *C. merolae* en pH neutro (B). El tamaño medio de las células para el control y para la cepa de células adaptadas a pH neutro se estimó en 3,88 y 6,02 μm , respectivamente. Las longitudes de onda de excitación fueron 488 nm (emisión de Chl en PSI y PSII) y 555 nm (emisión de PBS), respectivamente. La barra de escala corresponde a 2 μm .

5 La figura 12 muestra el análisis fluorimétrico modulado por amplitud de impulso (PAM) para las células de la cepa de control de *C. merolae* y para las células de la cepa novedosa de *C. merolae* adaptada a pH neutro. Se muestran: la eficiencia máxima del PSII (relación F_v/F_m , figura 12A), la inactivación no fotoquímica (NPQ, figura 12B) y la eficiencia fotoquímica del PSII (ϕPSII , figura 12C). Los datos representan valores de media \pm SD de 2 muestras biológicas independientes ($n = 2$).

10 **Ejemplos**

Ejemplo 1. Preparación de la cepa novedosa de *Cyanidioschyzon merolae* adaptada al crecimiento en condiciones de pH variables.

15 Algas rojas unicelulares (microalgas rojas) - *Cyanidioschyzon merolae*, la cepa de la colección NIES-1332, cuyas condiciones de cultivo de control convencionales son: medio M-Allen $\times 2$ (pH 2,5), 42 °C, 5 % de CO₂, luz blanca continua, 90 μE ($\mu\text{mol}_{\text{fot.}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), se adaptó a condiciones de pH variables, donde el valor más alto registrado fue de 6,7. Durante la adaptación, se demostró la alta flexibilidad de la cepa novedosa, con respecto a los diversos valores de pH aplicados.

Para el cultivo de la cepa novedosa se aplicaron los siguientes procedimientos:

1. Medio de cultivo como el anterior con modificaciones que garantizan un pH más alto.
- 20 Se usó ácido sulfúrico (VI) H₂SO₄ para ajustar el pH para valores de pH <3,5 e hidróxido de sodio NaOH para valores de pH >3,5, porque el pH del medio antes de la adición de H₂SO₄ es ~3,5. En el método, se usaron porciones sucesivas del medio de dilución con un pH cada vez más alto.
2. Medio de cultivo con pH aumentado que contiene adicionalmente tampón MES (ácido 2-morfolinoetanosulfónico) (CAS: 4432-31-9) 10 o 20 mM.

M-Allen x2 (1 l)	
MES	10 mM o 20 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 mM
KH ₂ PO ₄	4 mM
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2 mM
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1 mM
Reserva de restos A2	2 ml
Después de esterilizar en autoclave	
Solución madre de Fe A2	4 ml
Solución madre de oligoelementos A2 (100 ml)	
MnCl ₂ · 4H ₂ O	910 mM
H ₃ BO ₃	461 mM
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	161 mM
ZnCl ₂	77 mM
CuCl ₂ · 2H ₂ O	25 mM
CoCl ₂ · 6H ₂ O	17 mM
Solución madre de Fe A2 (100 ml)	
(filtrada, sin esterilizar en autoclave)	
EDTA · 2Na · 2H ₂ O	208 mM
FeCl ₃	148 mM

25 A continuación, el medio se esterilizó en autoclave.
Al medio M-Allen $\times 2$, después de esterilizarlo en autoclave, se le añadió una fuente de hierro, la denominada "solución madre de Fe", que se preparó previamente en condiciones estériles y se filtró.

Etapas sucesivas del experimento que dan lugar a la cepa novedosa:

- 30 1. Cultivo iniciador: *C. merolae* cepa NIES-1332 (DO₇₅₀ ~1, pH 2,6)

2. Serie preliminar de pases a un medio sin MES, con pH aumentado. El cultivo denso se diluyó con una pequeña cantidad del medio de cultivo, partiendo de un pH del cultivo de aproximadamente 3,5. Después de un periodo de crecimiento hasta una DO_{750} de aproximadamente 1,0 (aproximadamente 7-12 días, el tiempo depende de las condiciones de cultivo y de la densidad del cultivo), se llevó a cabo otro pase a una pequeña cantidad de otra porción fresca del medio de cultivo de pH más alto. Los pases se realizaron para mantener el aumento del pH del cultivo en aproximadamente 1 unidad de pH por pase. Los pases en esta etapa se llevaron a cabo hasta que el pH del cultivo fue de 5,5. El pase se realizó cuando la densidad del cultivo donador fue suficiente para proporcionar un número adecuadamente grande de células después del pase (se descubrió que el cultivo denso resiste mejor la agresión del cambio de pH).
3. Pases estabilizadores del pH con la adición de un agente tamponante, MES 10-20 mM, por ejemplo, 10 mM, para mantener un aumento del pH del cultivo de aproximadamente 0,5 unidades de pH por pase.
4. Pases estabilizadores del pH con la adición de un agente tamponante, MES 10-20 mM, por ejemplo, 10 mM, para obtener un pH final del cultivo de $\pm 6,7$.
5. Cultivo final con pH estable (6,5 - 6,8).

15 Etapas sucesivas del experimento que producen la cepa novedosa (descripción detallada del experimento):

Para el pase preliminar a un pH más alto, se usaron los siguientes procedimientos:

- cultivo iniciador con crecimiento estable, a $DO_{750} \sim 1$, pH 2,6 (pH ajustado con ácido sulfúrico (VI)).
- medio M-Allen x 2 modificado, sin MES con pH $\sim 6,5$ (pH ajustado con hidróxido de sodio, NaOH)

20 El cultivo iniciador se inoculó en el medio M-Allen x 2 con un pH aumentado. Dado que no se usa ningún agente tamponante MES en los primeros pases, el pH apropiado debe determinarse midiéndolo con un pehachímetro mezclando el cultivo iniciador y el medio M-Allen x 2 (pH más alto) en condiciones estériles en un mechero. Sin embargo, en este caso, el pH del medio M-Allen x 2 debería ser tan alto como aproximadamente 7,7. A continuación se proporciona un ejemplo de ajuste del pH del medio de cultivo sin el uso de un agente tamponante. Una parte crucial del procedimiento es obtener el pH apropiado después del pase:

25 Medio M-Allen x 2: Ajuste del pH antes de la esterilización en autoclave y valores de pH ejemplares:

N.º de prueba	Antes de la adición de la solución madre de Fe	Después de la adición de la solución madre de Fe
1	7,03	6,94
2	7,64	7,52

30 Para el experimento se usó lo siguiente: frascos estériles de 750 ml/175 cm² para el cultivo en suspensión, con tapón de rosca Plug-Seal, Nest Scientific Biotechnology. Los frascos con el cultivo se protegieron de la luz con papel de aluminio durante los primeros 3-4 días de cultivo en una cámara o se aplicó luz de baja intensidad de 30 μE ($\mu mol_{tot} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$). El cultivo celular se realizó en una estufa de incubación Panasonic termostática (modelo MLR-352) a una temperatura constante de 42 °C y la intensidad de la luz blanca se aumentó gradualmente de 30 μE a 90 μE ($\mu mol_{tot} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$), dependiendo de la densidad óptica del cultivo supervisada a 750 nm (densidad óptica a 750 nm, DO_{750}) durante todo el cultivo. La fuente de luz blanca fueron lámparas de tipo GrowLight (tipo PANASONIC FL40SS ENW/37).

Pase (1)

N.º	Día de cultivo	Valor de pH antes de la adición del cultivo iniciador	Cantidad de medio M-Allen x 2 (de pH más alto)	Cantidad de cultivo iniciador añadida (a partir de pH 2,61 ácido)	Nuevo pH	Nueva DO_{750}^*
1	inicio	6,94	75 ml	25 ml	3,57	0,3291
2	inicio	7,52	75 ml	27,5 ml	5,45	0,3677

*El nuevo cultivo no debe presentar DO_{750} inferior a 0,3.

35 Para el cultivo donador con $DO_{750} > 1,4$, el nuevo cultivo debe presentar $DO_{750} > 0,01 \cdot E$ (donde E es la intensidad de PAR en $\mu mol_{tot} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) - correlación entre la DO_{750} inicial y la intensidad de la iluminación.

ES 2 983 647 T3

N.º	1	2
Día de cultivo	3 (72 h)	3 (72 h)
DO ₇₅₀	0,4507	0,4781
pH	3,43	4,11
Día de cultivo	7	7
DO ₇₅₀	0,7361	0,7487
pH	3,21	3,56
Día de cultivo	12	12
DO ₇₅₀	1,0229	1,0521
pH	3,01	3,24

A DO₇₅₀ ~1,0, se debe realizar otro pase a un medio fresco sin agente tamponante MES.

Pase (2)

N.º	Día de cultivo	Valor de pH para cultivo después del día 12 (del pase 1) Cultivo donador	Cantidad de medio M-Allen x 2, pH 7,0	Cantidad de cultivo añadida del pase previo	Nuevo pH	Nueva DO ₇₅₀ *
1	inicio	3,01	75 ml	75 ml	4,02	0,5655
2	inicio	3,24	75 ml	75 ml	5,45	0,5953

N.º	1	2	
Día de cultivo	3 (72 h)	3 (72 h)	
DO ₇₅₀	0,7681	0,7762	
pH	3,60	3,98	
Día de cultivo	8	8	→ donador
DO ₇₅₀	1,1160	1,1648	
pH	3,31	3,35	

5 Pase (3)

En este pase, se usó por primera vez el agente tamponante MES 20 mM, pero solo se usó en el cultivo n.º 2 a modo de comparación:

Cultivo n.º 1: pase en una relación de 1:1; el factor de dilución del cultivo donador con un medio de cultivo fresco (sin MES) es 2x; el nuevo pH del cultivo celular es de 5,19.

10 Cultivo n.º 2: pase al medio M-Allen x 2, pH 5,7 (con MES 20 mM); el factor de dilución del cultivo donador con un medio de cultivo fresco es de 2,8 veces; el nuevo pH del cultivo celular es de 5,6.

N.º	1	2
Día de cultivo	3 (72 h)	3 (72 h)
DO ₇₅₀	0,7864	0,6592
pH	3,98	5,26
Día de cultivo	9	9

DO ₇₅₀	1,1777	1,2416
-------------------	--------	--------

Los pases posteriores a DO₇₅₀ ~1,0 ya se realizaron utilizando el medio M-Allen × 2 con MES 20 mM.

En el pase 5 - 6, se obtiene un cultivo estable con un pH de aproximadamente 6,0 y, a partir de ese punto, puede comenzar el pase al medio M-Allen × 2 (con MES 20 mM) con pH >6,0.

- 5 Los días adaptativos son entre 2 y 5 días. La figura 1 muestra el crecimiento del cultivo en constante crecimiento a pH >6,0. La figura 2 muestra una cepa estable en condiciones de laboratorio en una cámara de crecimiento. En la figura 3 se muestra una fotografía del cultivo al microscopio óptico. En la figura 4 se muestran fotografías de las biopelículas producidas por las células de la cepa novedosa a pH >6,0, comparadas con la biopelícula producida por el cultivo iniciador de control a pH 2,5.
- 10 La viabilidad del cultivo de la cepa novedosa también se evaluó analizando células individuales de *C. merolae* con el microscopio de fluorescencia LS720 (Etaluma) con un aumento de 40 y excitación de la clorofila a 580-598 nm. La figura 5 muestra una comparación de la cepa novedosa obtenida y cultivada a pH elevado (pH >6), con una cepa de control (cultivo iniciador cultivado a pH 2,5), que muestra un nivel comparable de fluorescencia de los cloroplastos y, por tanto, la viabilidad del cultivo. La figura 6 muestra imágenes por microscopía de fluorescencia de la emisión de clorofila de cloroplastos individuales presentes en las células de la cepa de *C. merolae* obtenida y cultivada a pH >6, que forman una biopelícula sobre el sustrato de fibra de algodón.
- 15

También se analizó el contenido de lípidos de la cepa obtenida. Los lípidos se cuantificaron con el método colorimétrico de sulfo-fosfo-vainillina (SPV) a 526 nm. Para cultivos a pH 2,5 y 6,7, la cantidad de lípidos en una biomasa fresca fue de un 16,03 % y un 16,46 %, respectivamente.

20 Información adicional:

1. Nota: cuando la DO₇₅₀ empieza a disminuir notablemente y las células comienzan a morir, el cultivo no debe interrumpirse, sino que se debe proporcionar una mejor protección contra la luz para el cultivo. Después de unos días (muy a menudo 3-4), cuando se produce la adaptación principal, las células deben comenzar a crecer nuevamente. La razón de la muerte se debe habitualmente a una dilución demasiado excesiva del cultivo, siendo el aumento del pH demasiado alto, con respecto a la densidad del cultivo.
- 25 2. Se observó que se puede realizar una adaptación más prolongada añadiendo medio M-Allen × 2 (~pH 6,5) con agente tamponante MES 10 mM al cultivo con pH aumentado, después de los pocos primeros pases sin MES.
3. La temperatura óptima para el cultivo es de 42 °C, pero es posible el cultivo a una temperatura diferente, por ejemplo, más baja (por ejemplo, 25 °C).
- 30 4. El ciclo de crecimiento de la cepa es variable, por tanto, dependiendo de la adaptación del cultivo iniciador de pH 2,5 a las condiciones de pH más alto, el nuevo cultivo puede presentar una tasa de crecimiento diferente en pases posteriores.
5. El crecimiento de las algas requiere condiciones estériles, especialmente para las etapas de preparación del medio de cultivo con pH más alto.
- 35 6. La cepa es autótrofa y requiere mezcla automática en la cámara para que las células no se depositen en el fondo de los matraces de cultivo.
7. La nueva cepa tiene propiedades formadoras de biopelícula.
8. La adaptación de la cepa a un nuevo pH se produce con bastante rapidez, cuando se usan las etapas de adaptación clave adecuadas, mencionadas anteriormente.

40 **Ejemplo 2. Características bioquímicas y espectroscópicas de la cepa novedosa de *C. merolae* adaptada al crecimiento a pH neutro**

La figura 7 muestra los resultados obtenidos usando espectroscopia de absorción RT para las cepas de *C. merolae*: de control (figura 7A) y la cepa novedosa adaptada a pH neutro (figura 7C). Para determinar las curvas de crecimiento, se determinó la densidad óptica (DO) para ambas cepas a 683 nm (figura 7B) y 750 nm (figura 7D). La figura 7E muestra la relación de los picos de absorbancia correspondientes a los ficobilisomas (630 nm, PBS) y a los fotosistemas I y II (680 nm, PS) para cada punto temporal de las curvas de crecimiento. Los datos de las curvas de crecimiento son medias ± SD para dos réplicas de 2 muestras biológicas independientes (n = 4).

45

Las curvas de crecimiento de la cepa de *C. merolae* obtenida y descrita en el ejemplo 1, a pH neutro, supervisadas a dos longitudes de onda (683 nm y 750 nm) (figuras 7B y 7D) muestran que la cepa novedosa de *C. merolae* tiene una dinámica de crecimiento celular similar a la cepa de control (figuras 7B, 7D), y el día 18 de cultivo con iluminación de 90 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ se encuentra en la denominada fase de crecimiento "logarítmica media".

- 5 El contenido de las proteínas de la antena captadora de luz vinculadas funcionalmente al fotosistema II (PSII, enzima de fotooxidación del agua) denominadas ficobilisomas (PBS) en general es menor (a partir del día 5 de cultivo, figura 7E) para la cepa novedosa adaptada a vivir a pH neutro en comparación con la cepa de control (cultivo a pH 2,5), lo que muy probablemente esté relacionado con la formación de un mecanismo adaptativo fotoprotector en las células de la cepa novedosa. Este mecanismo (que reduce la cantidad de proteínas de PBS vinculadas funcionalmente al PSII) permite que la nueva cepa de *C. merolae* funcione mejor con una iluminación más alta (por encima de 1000 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) mediante un cambio en la estructura del PSII (lo que reduce las antenas del PSII funcionales que absorben la luz), lo que garantiza la minimización de la agresión provocada por una alta intensidad de luz y, por tanto, la protección contra la fotoinhibición del aparato fotosintético con mucha luz (véase a continuación para un análisis de los resultados obtenidos por las mediciones de fluorescencia de PAM mostradas en la figura 12).
- 10
- 15 En las figuras 7 y 8 se muestran nuevos datos sobre la fluorescencia de las proteínas de la antena de PBS vinculadas funcionalmente al PSII en comparación con la emisión de los complejos fotosintéticos PSII y fotosistema I (PSI). Los cambios en el contenido de las antenas de PBS funcionales se supervisaron durante el cultivo de *C. merolae* (una cepa novedosa en pH neutro en comparación con la cepa de control a pH 2,5) mediante mediciones espectroscópicas (espectros de absorbancia en la figura 7 y espectros de fluorescencia a baja temperatura en la figura 8).
- 20 Además, no se encontró ninguna unión funcional de PBS a PSI en ninguna de las dos cepas de *C. merolae* examinadas, como muestran las mediciones de los espectros de excitación registrados para la longitud de onda de la luz absorbida por el PSI (728 nm, figura 8K). Estas dos estrategias de investigación independientes confirmaron la tendencia descrita anteriormente a reducir el contenido de proteínas de la antena de PBS vinculadas funcionalmente al PSII en la cepa novedosa de *C. merolae* adaptada a vivir a pH neutro.
- 25 La cepa novedosa de *C. merolae* adaptada al crecimiento a pH neutro se caracteriza por una actividad del complejo fotooxidante del agua (PSII) igual de alta que la cepa de control, como se muestra en la figura 9. Del mismo modo, la actividad de la respiración celular es similar en la cepa novedosa a pH neutro en comparación con la cepa de control (figura 9).
- 30 El contenido total de lípidos (medido colorimétricamente según Mishra *et al.*, 2014) es similar en la cepa novedosa de *C. merolae* adaptada al crecimiento a pH neutro en comparación con la cepa de control. De promedio, es de 518 ± 89 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cultivo para la cepa a pH neutro y de 604 ± 66 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cultivo para la cepa de control (figura 10) a $\text{DO}_{682} = 1$ para ambos tipos de cultivo celular.
- 35 La microscopia confocal mostró que el tamaño de las células de la cepa novedosa de *C. merolae* adaptada al crecimiento a pH neutro es, de promedio, 1,6 veces mayor en comparación con la de las células de control (figura 11). El patrón de las membranas fotosintéticas en cloroplastos individuales de las células de la cepa novedosa es similar al de la cepa de control. Se observaron estructuras intracelulares no fluorescentes en las células de la cepa novedosa (figura 11B), que no se encontraron en las células de la cepa de control. Se supone que estas nuevas estructuras intracelulares representan cuerpos lipídicos.
- 40 Los parámetros de eficiencia fotoquímica y no fotoquímica de las células de la cepa novedosa se examinaron comparándolas con la cepa de control (figura 12). El rendimiento cuántico máximo de la enzima fotooxidante del agua, PSII (F_v/F_m , figura 6A) es similar para la cepa novedosa a pH neutro y la de control. El parámetro de inactivación no fotoquímica medido es similar para ambas cepas (NPQ, figura 12B), mientras que la eficiencia fotosintética (cantidad relativa de luz absorbida por el complejo PSII, usada para procesos fotoquímicos) es, de promedio, un 20 % menor en las células de la cepa novedosa a pH neutro en comparación con la de control (ΦPSII , figura 12C). Esta observación, junto con una reducción en el número de complejos de antena de PBS vinculados funcionalmente al complejo PSII (figuras 7 y 8), constituye un mecanismo de adaptación inducido en las células de la cepa novedosa de *C. merolae*, que permite que estas células funcionen mejor a altas intensidades de luz al minimizar los procesos de sobreexcitación del complejo PSII. La reducción mencionada anteriormente de la cantidad de proteínas de antena de PBS facilita significativamente el cultivo de la cepa novedosa en grandes volúmenes, al minimizar el efecto negativo de la protección contra la luz sobre el aumento de la biomasa del cultivo celular a gran escala, lo que es importante para mejorar el valor de aplicación de la cepa novedosa.
- 50

Bibliografía

Mishra SK, Suh WI, Farooq W, Moon M, Shrivastav A, Park MS, Yang J-W (2014) Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource Technol*, 155, 330-333.

55

REIVINDICACIONES

1. Una cepa del alga roja unicelular *Cyanidioschyzon merolae*, depositada el 25 de octubre de 2019 según los requisitos del tratado de Budapest en el Banco Español de Algas, Las Palmas, España, con el número BEA_IDA 0073B.
- 5 2. Uso de la cepa de la reivindicación 1 para biorremediación.
3. El uso para biorremediación según la reivindicación 2, caracterizado por que la biorremediación incluye la eliminación de metales pesados.
4. El uso para biorremediación según la reivindicación 2 o 3, caracterizado por que las aguas residuales o subterráneas se someten a biorremediación.
- 10 5. Uso de la cepa de la reivindicación 1, para la producción de biocombustibles.
6. El uso para la producción de biocombustibles según la reivindicación 5, caracterizado por que la cepa produce lípidos, incluyendo, en particular, triacilglicerol.
7. El uso para la producción de biocombustibles según la reivindicación 6, caracterizado por que la producción de lípidos se estimula con rapamicina.

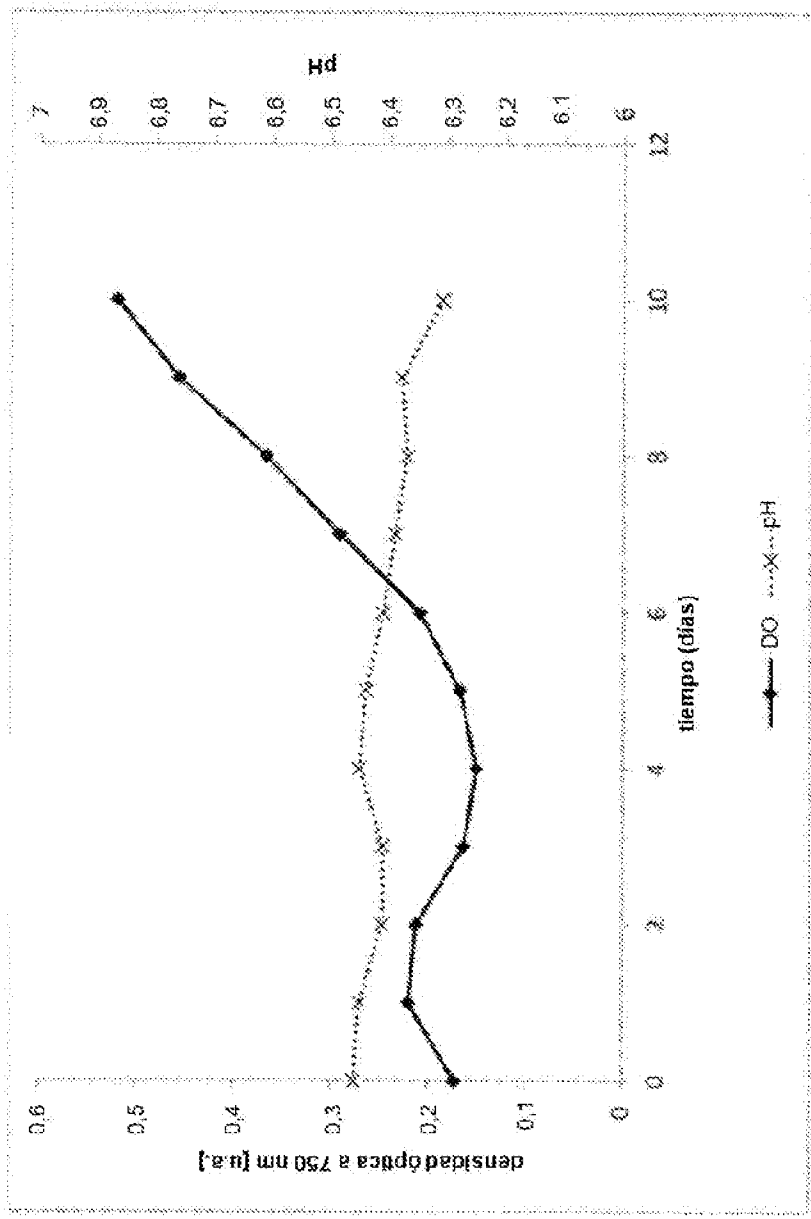


Fig. 1

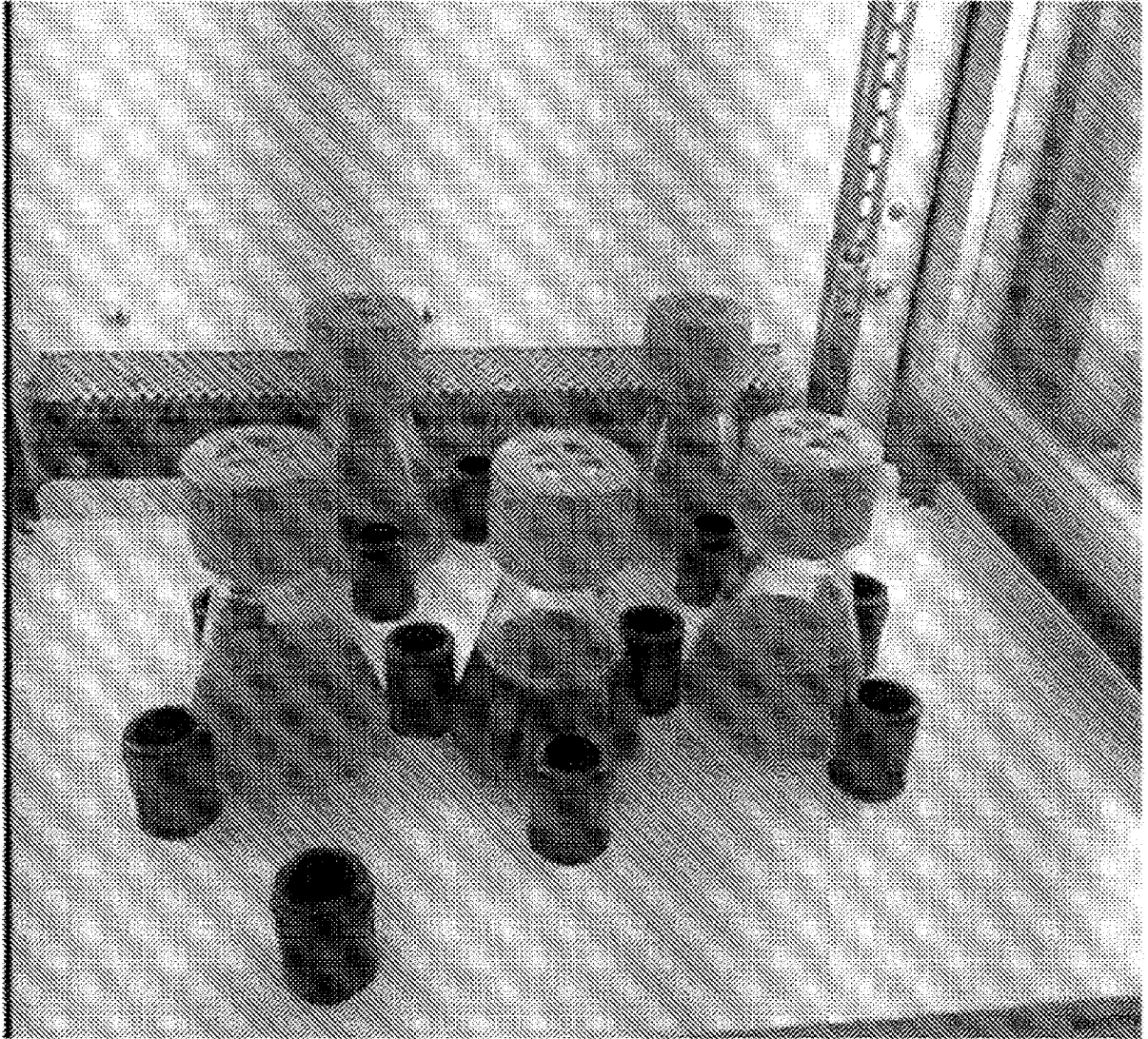


Fig. 2

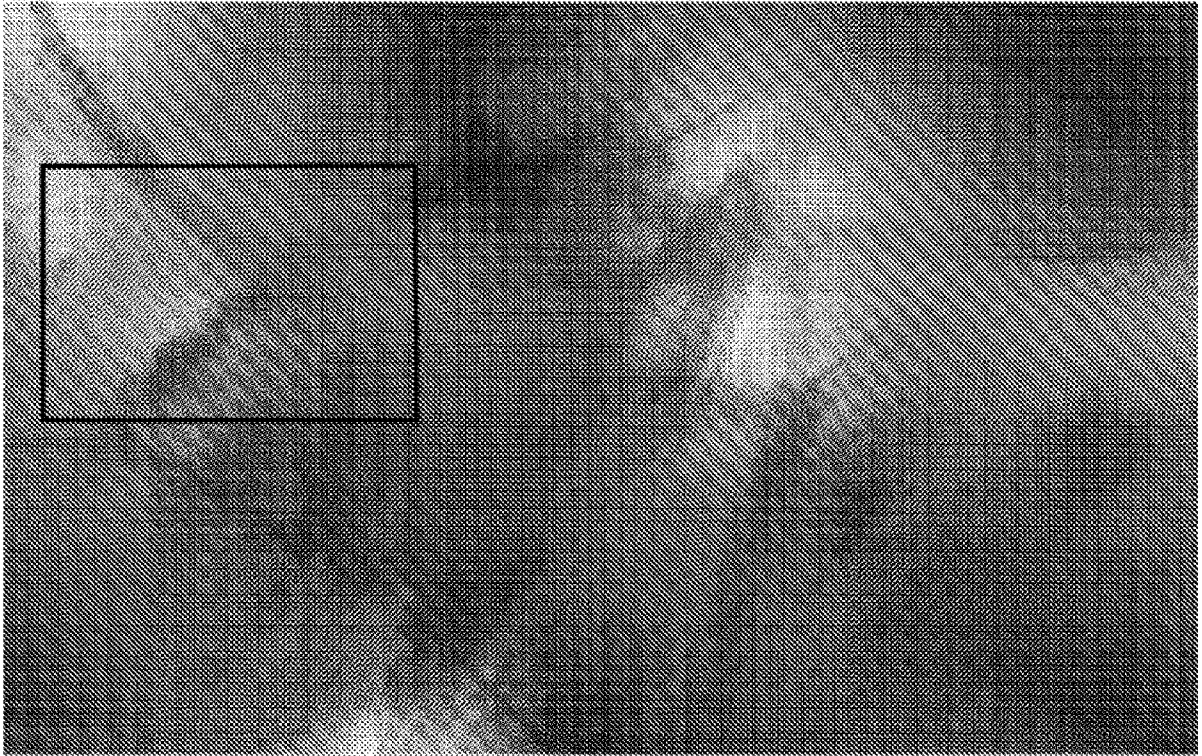


Fig. 3

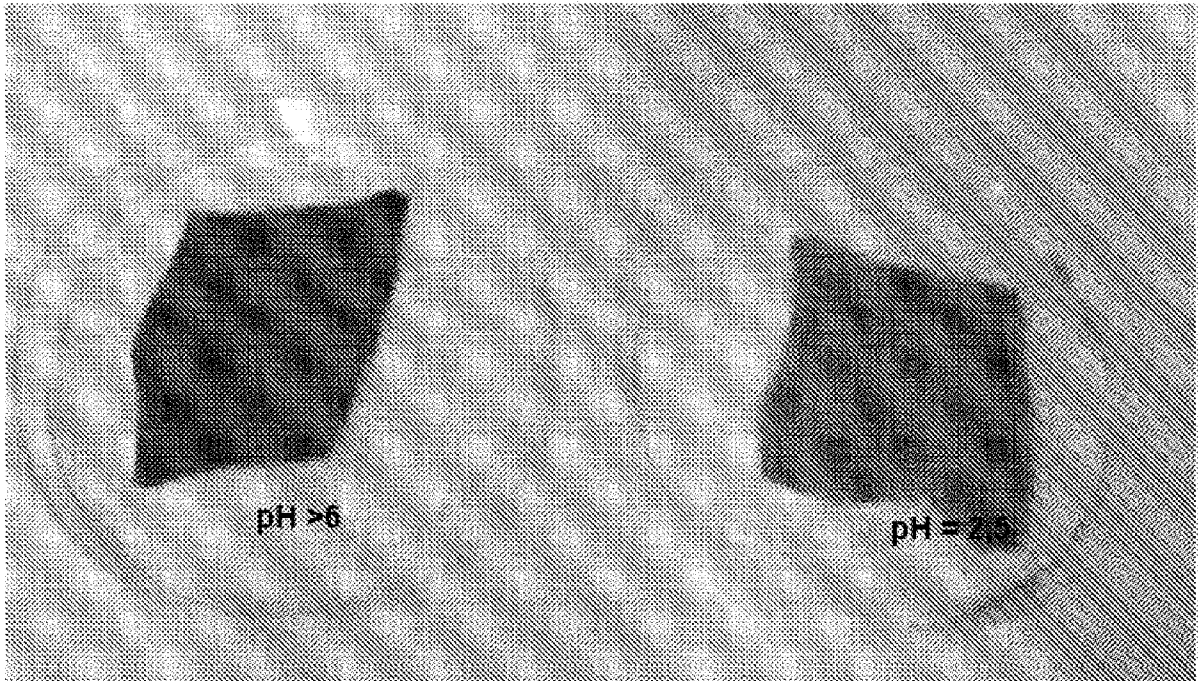
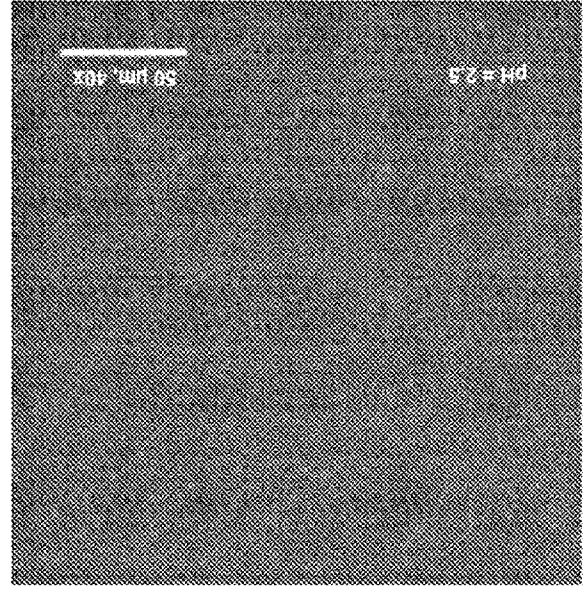
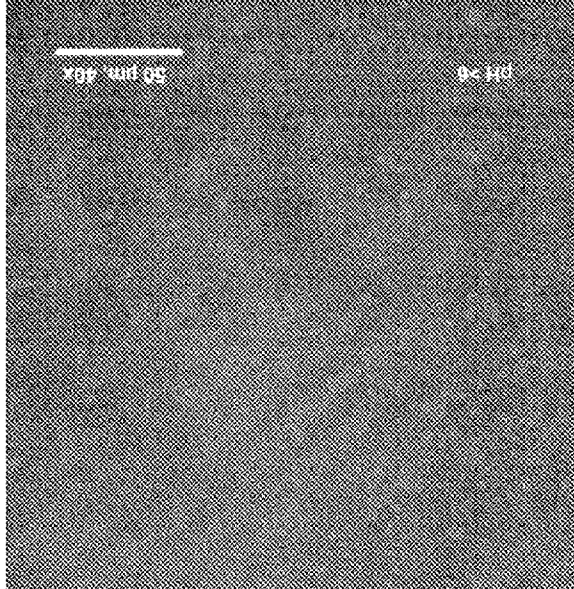


Fig. 4

Fig. 5



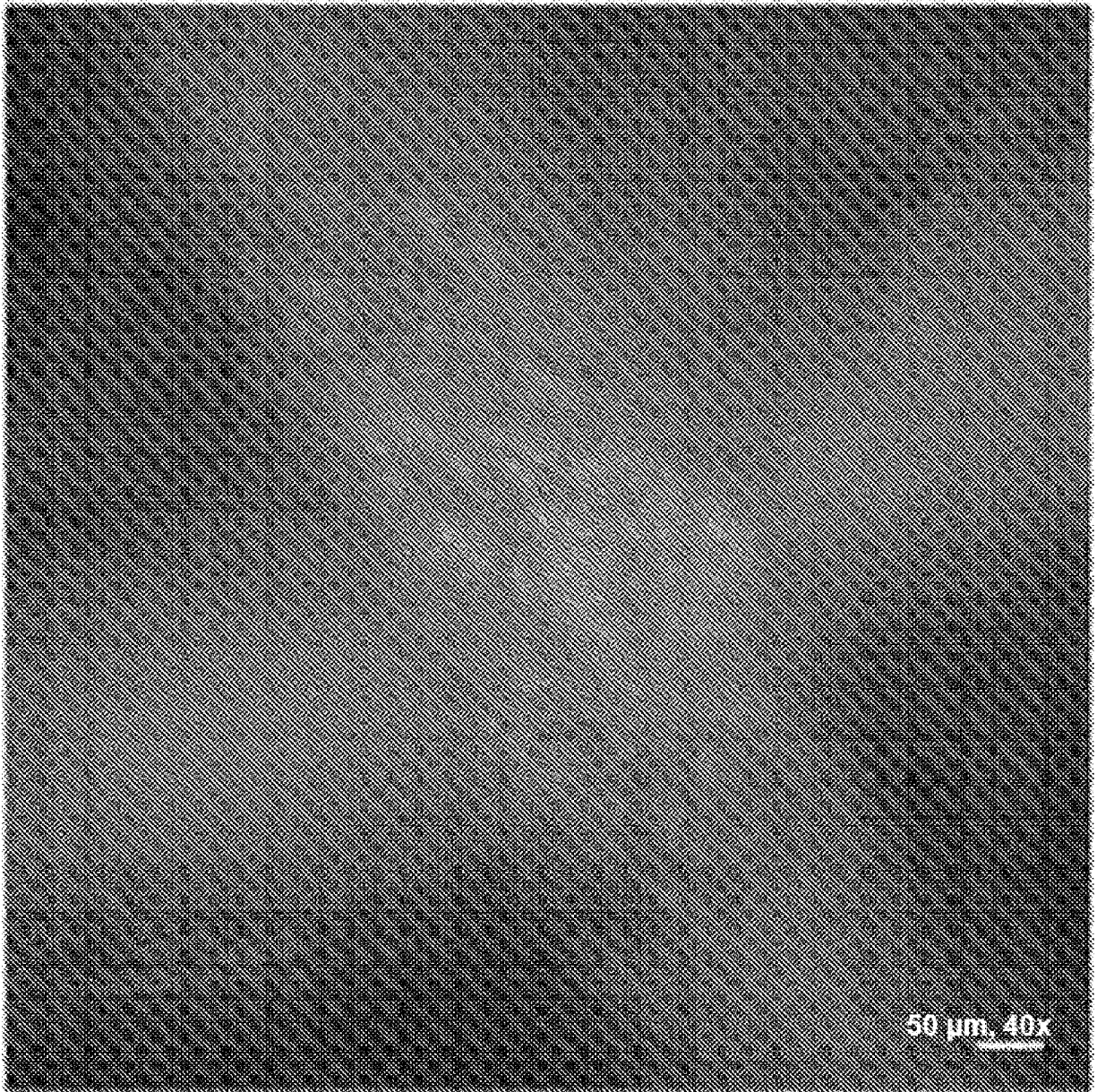


Fig. 6

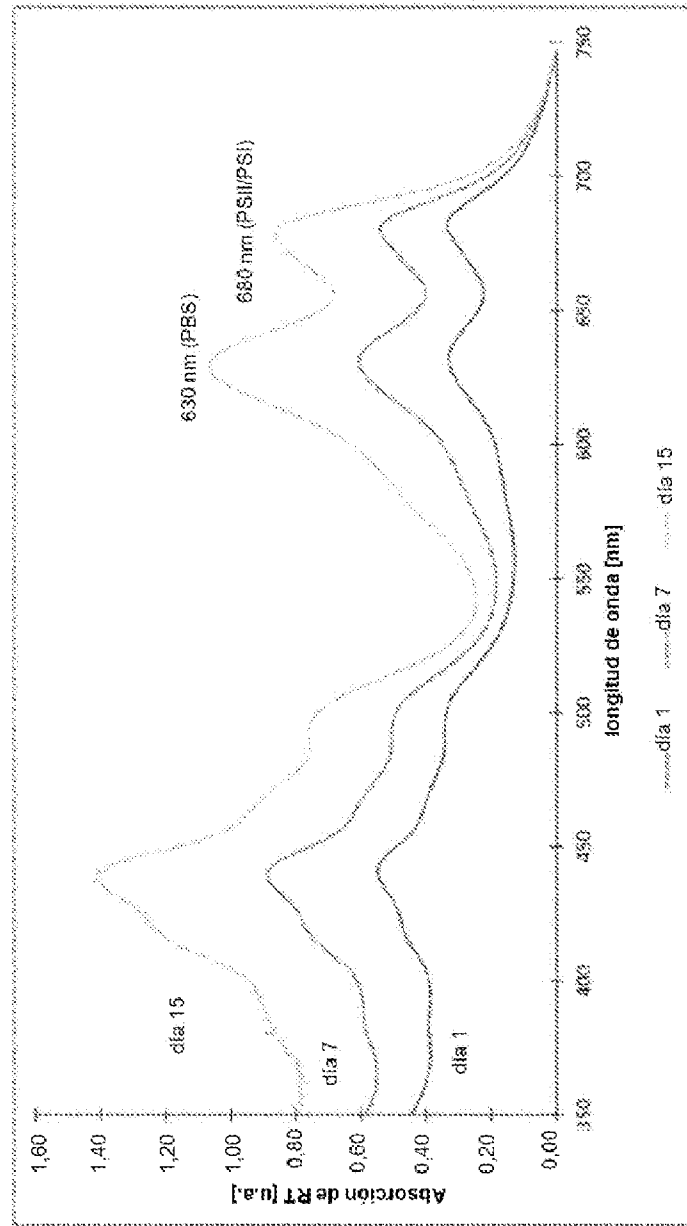


Fig. 7A

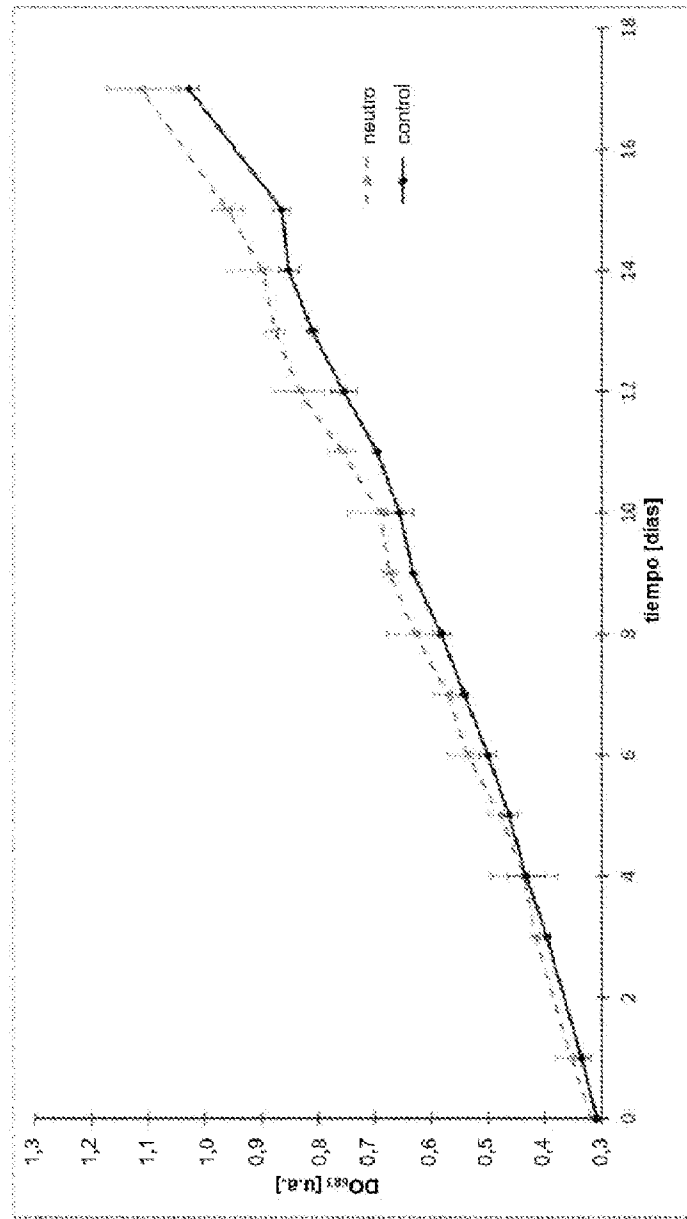


Fig. 7B

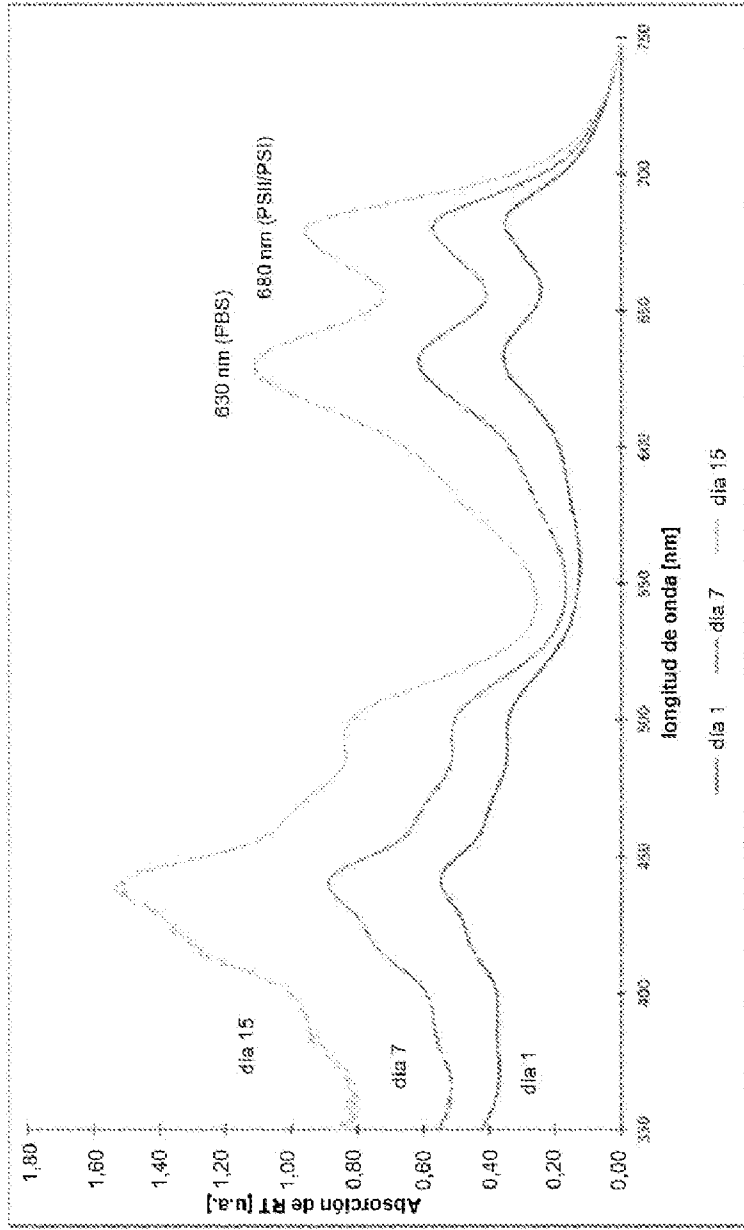


Fig. 7C

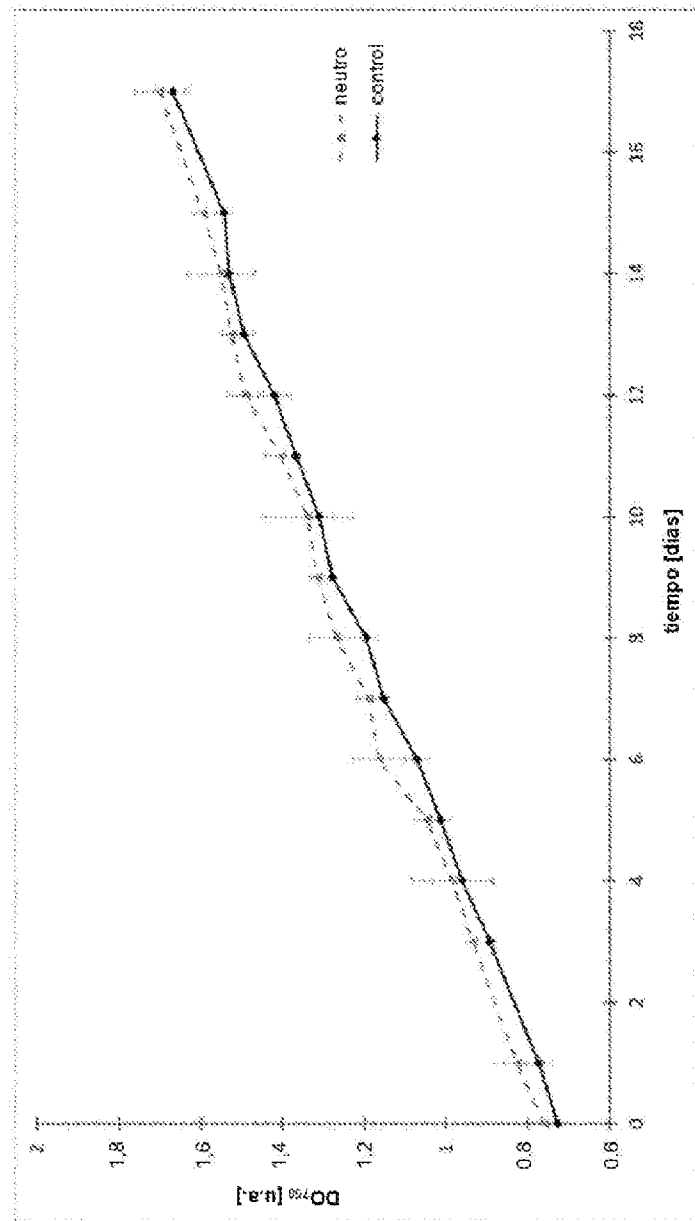


Fig. 7D

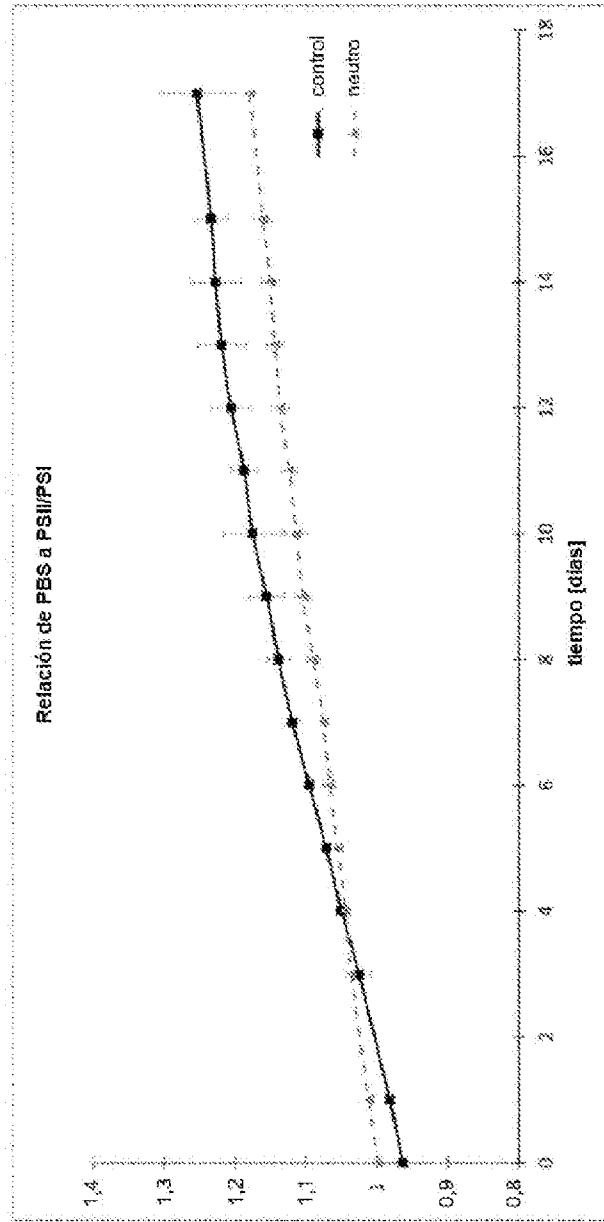


Fig. 7E

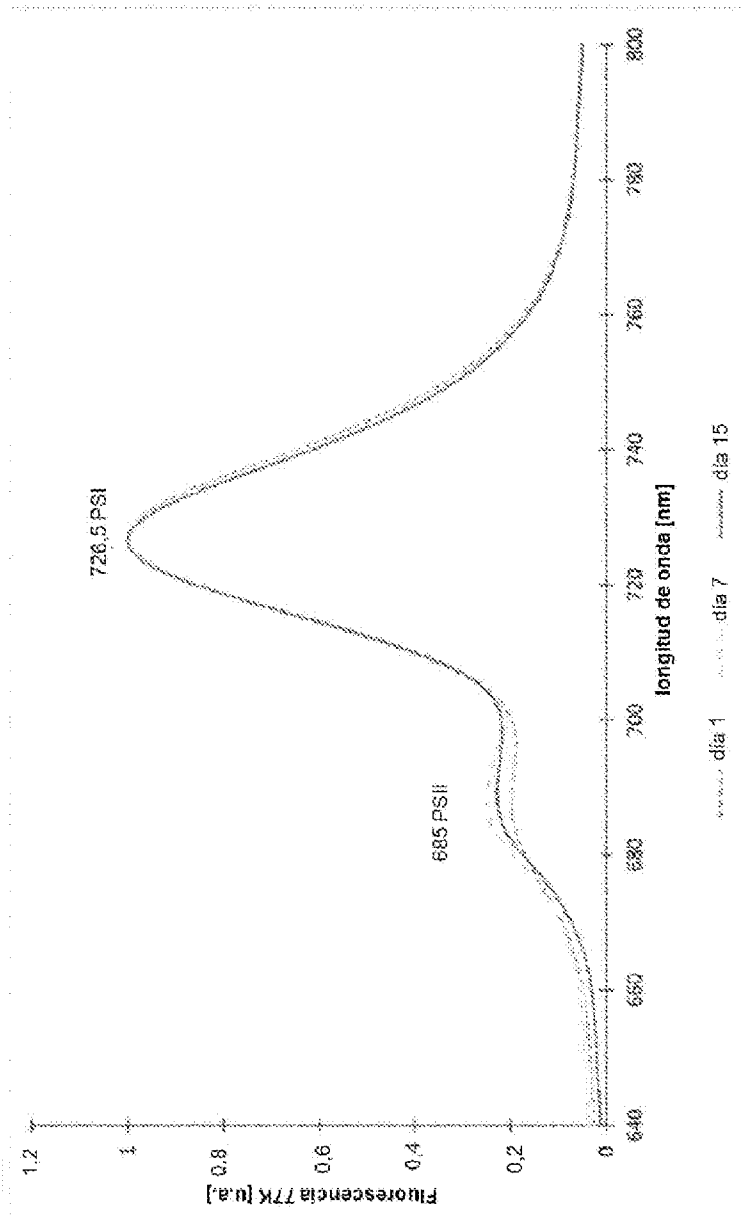
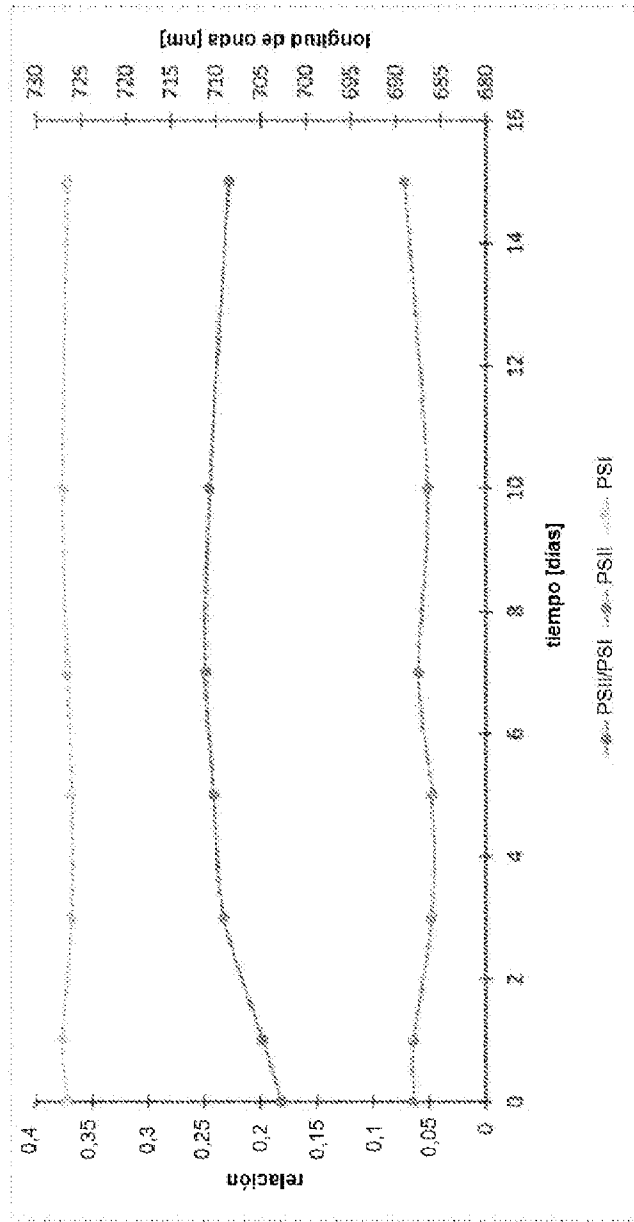


Fig. 8A



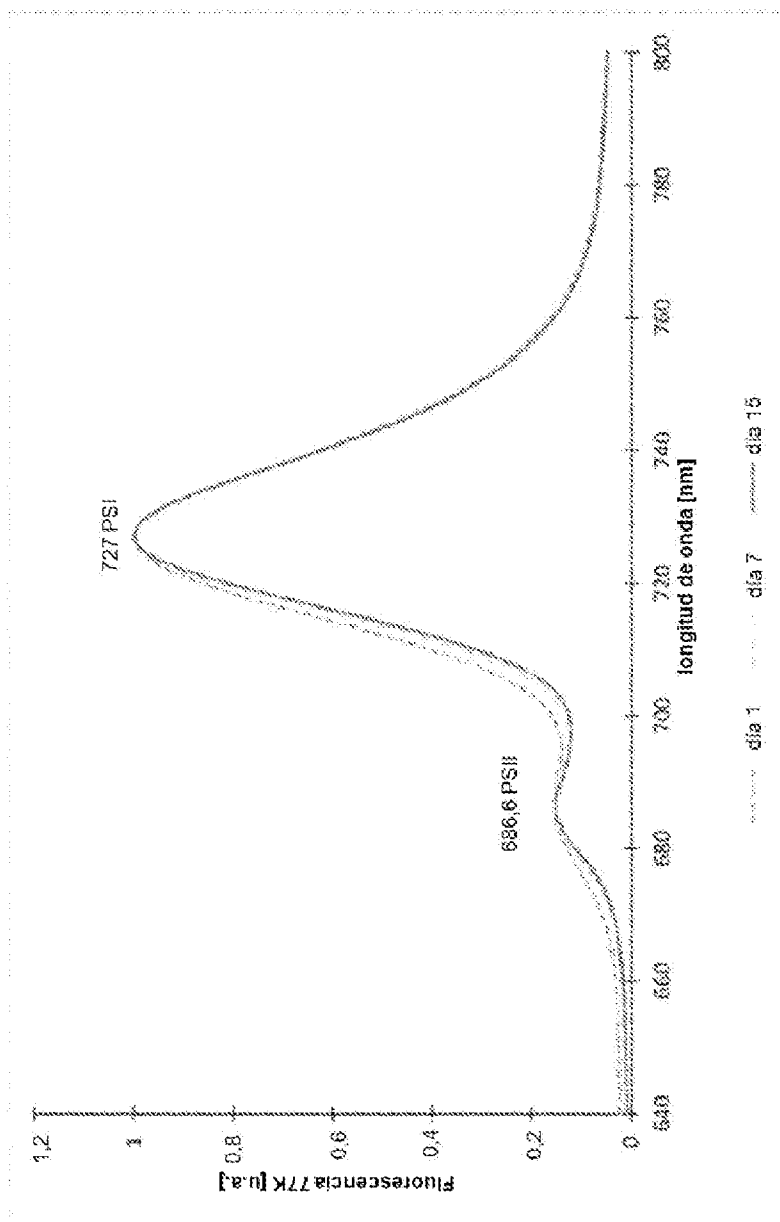


Fig. 8C

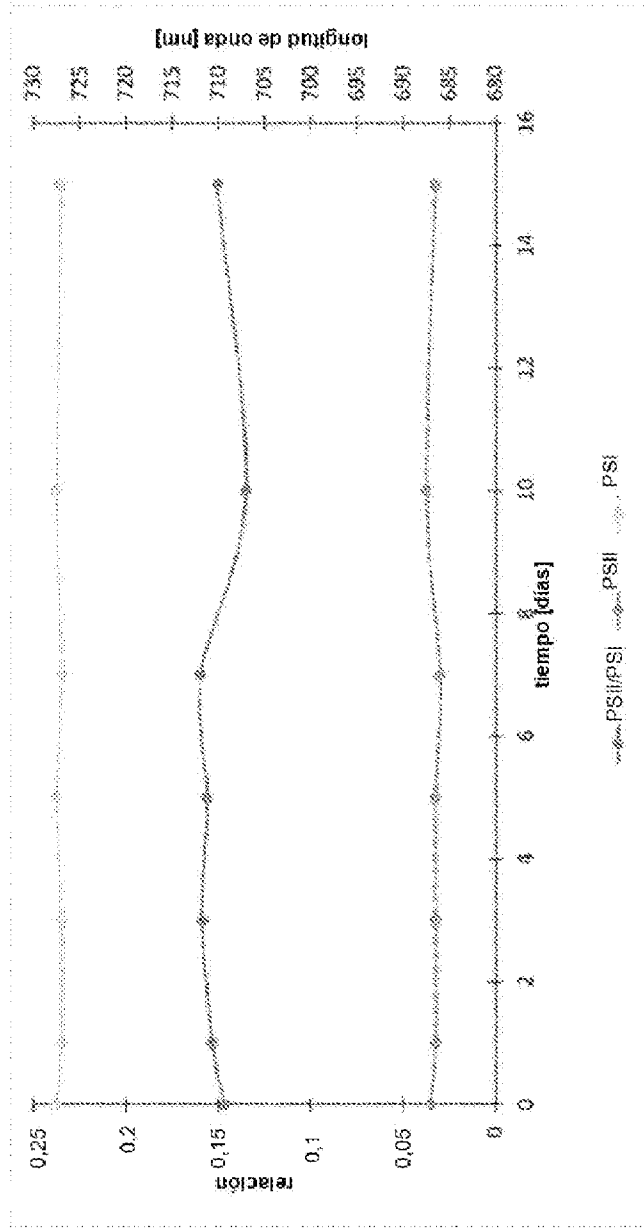


Fig. 8D

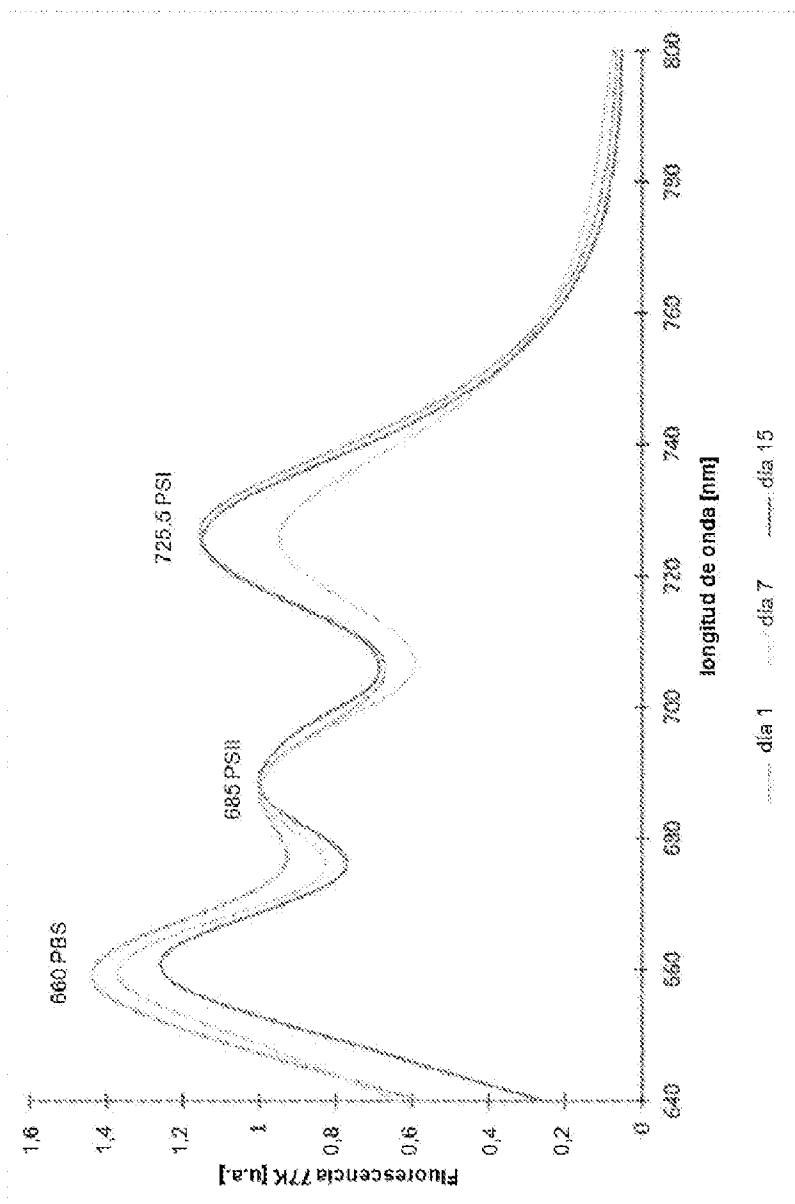


FIG. 8E

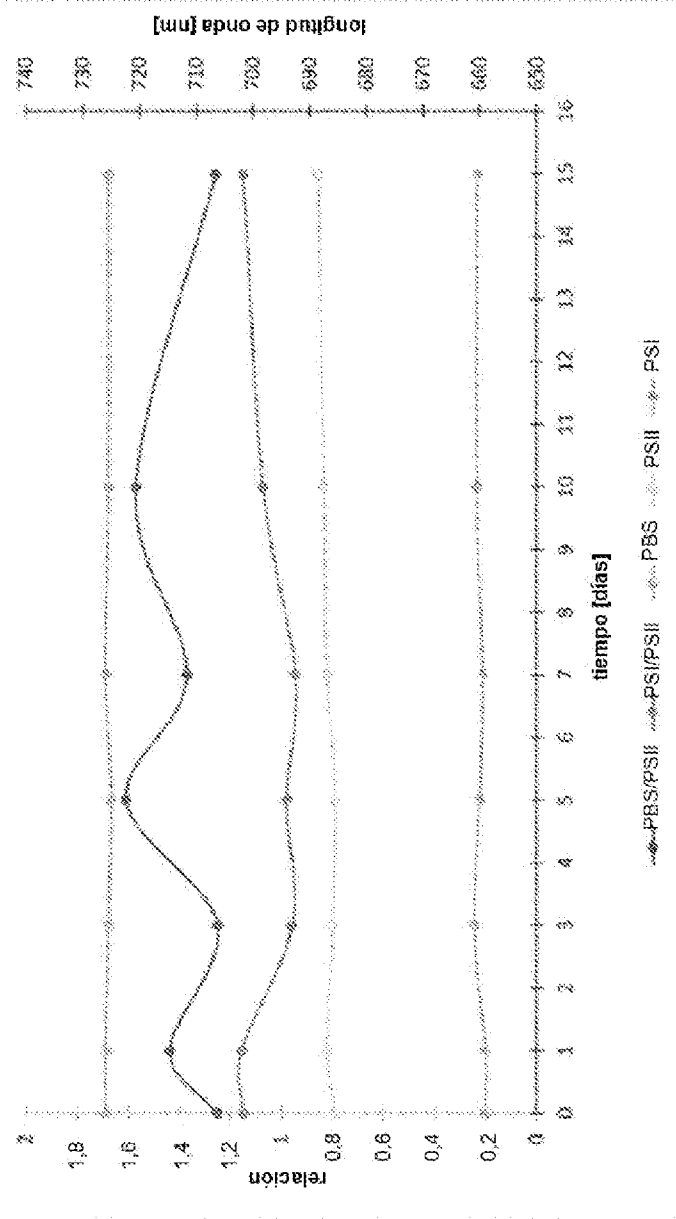


Fig. 8F

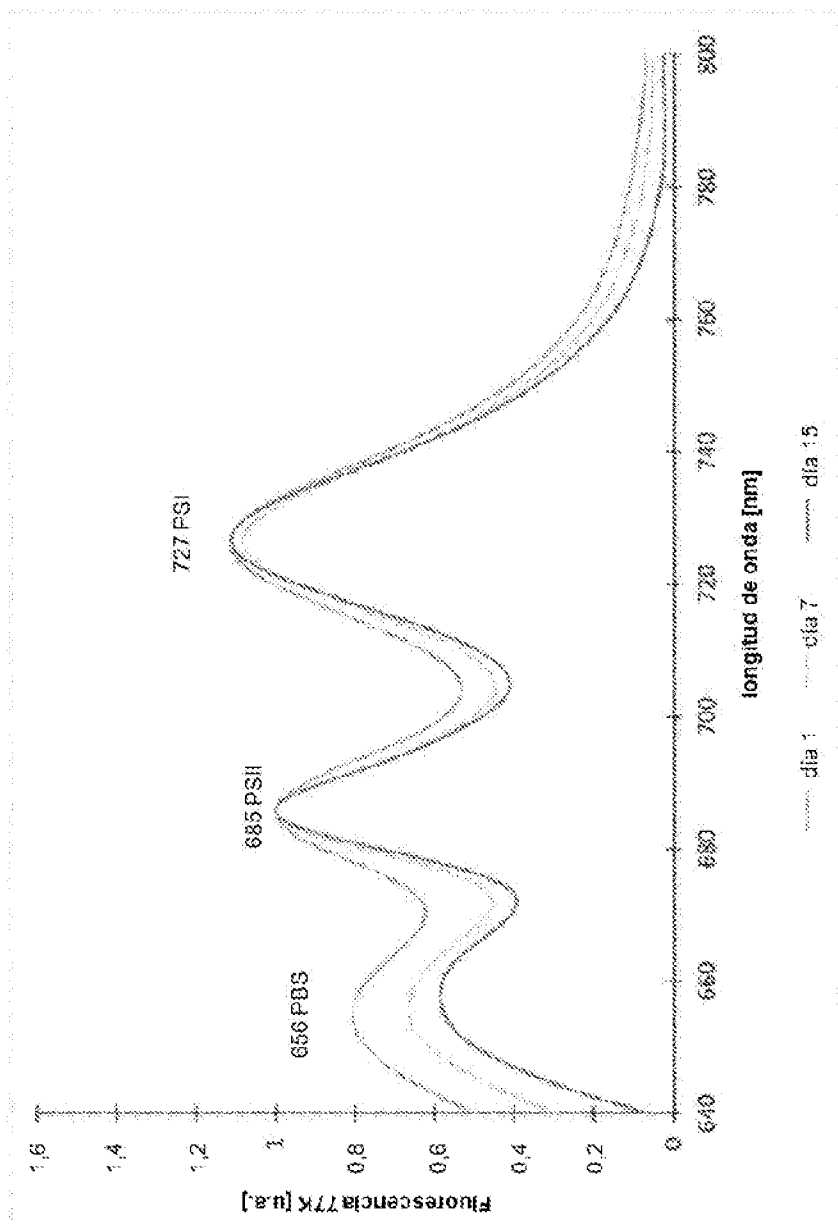


Fig. 8G

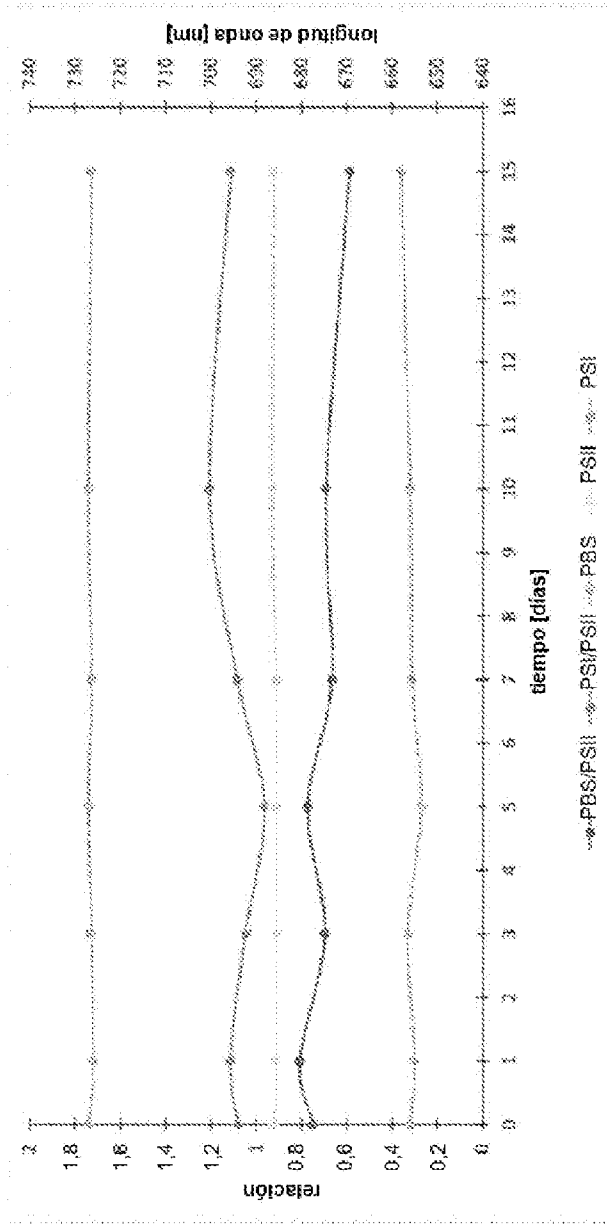


Fig. 8H

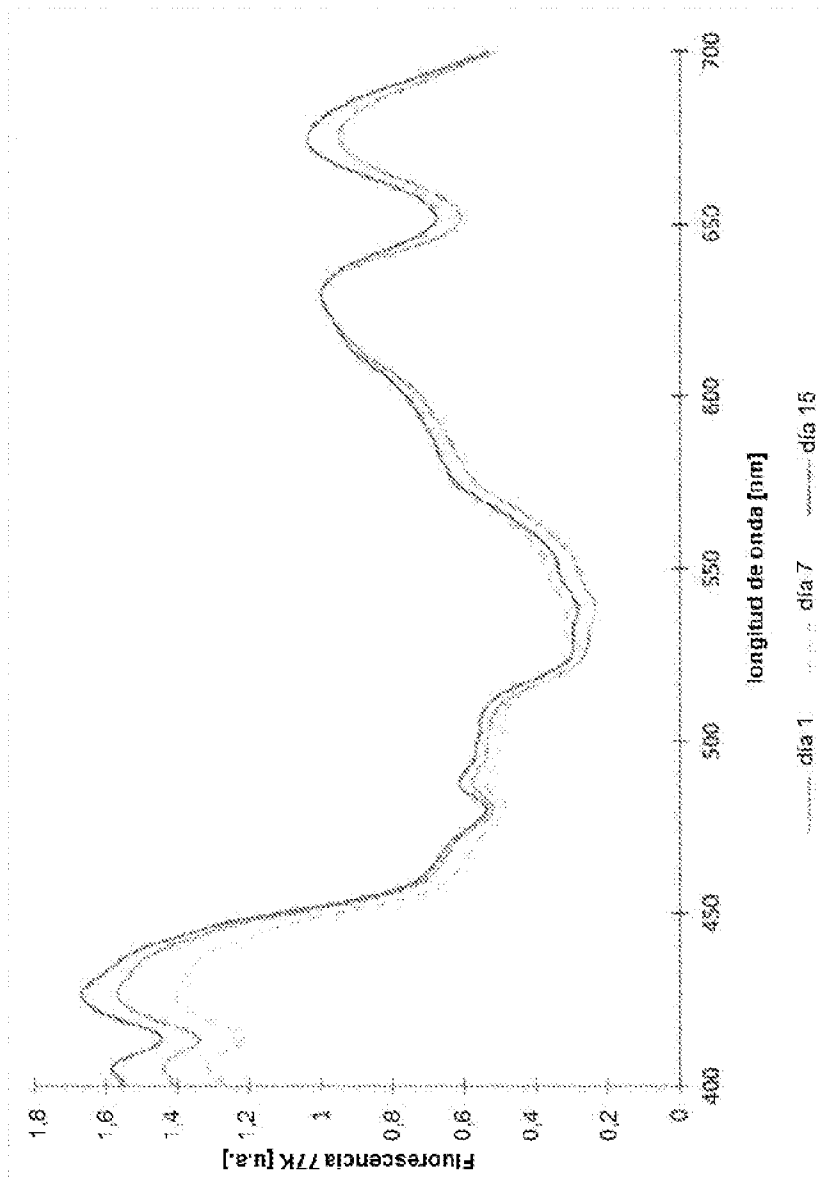


FIG. 8I

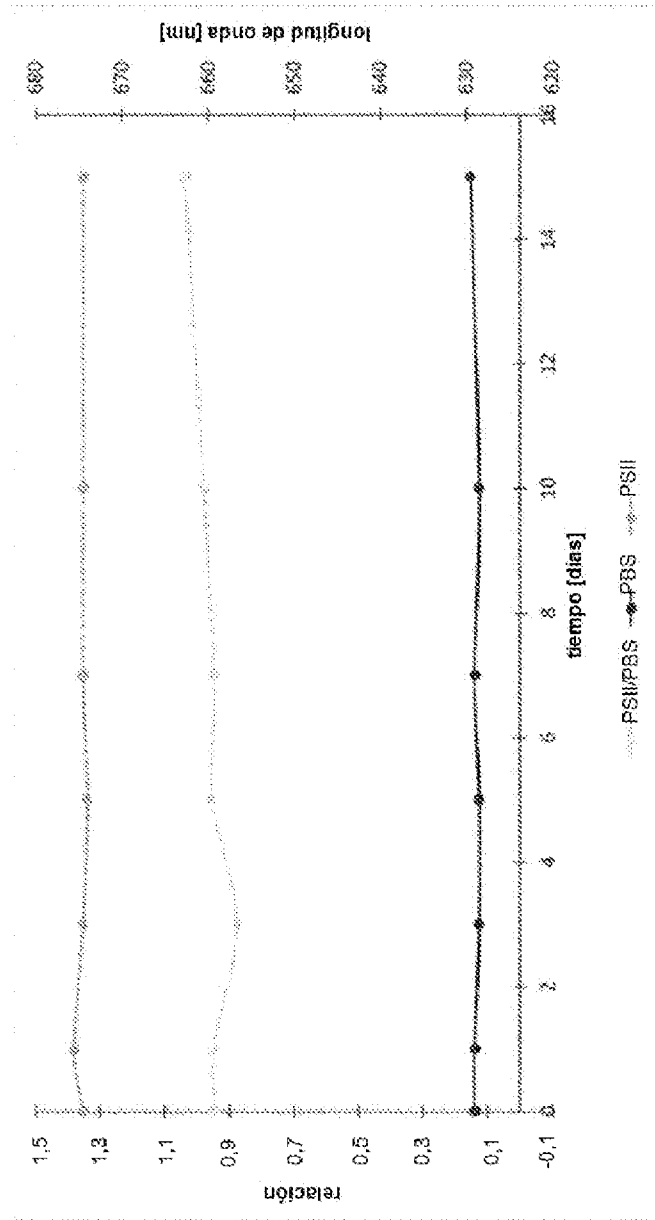


Fig. 8J

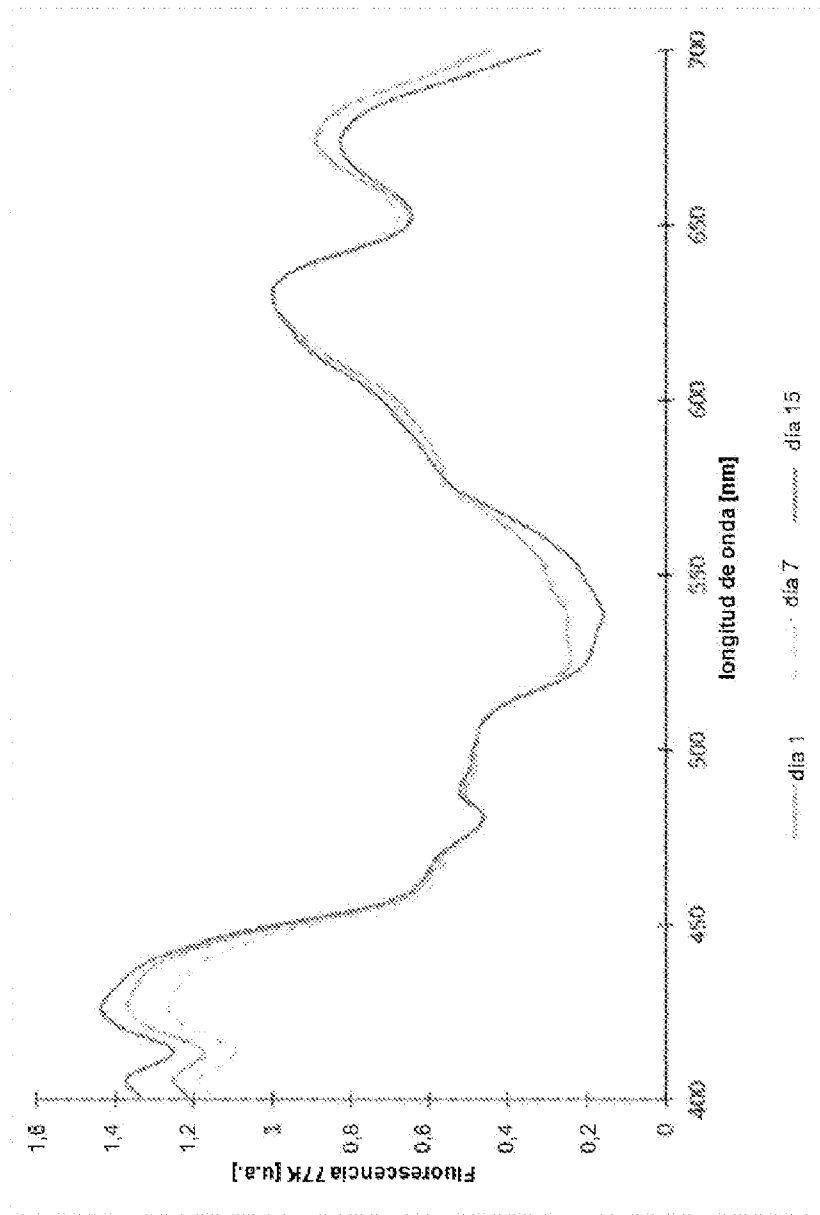


Fig. 8K

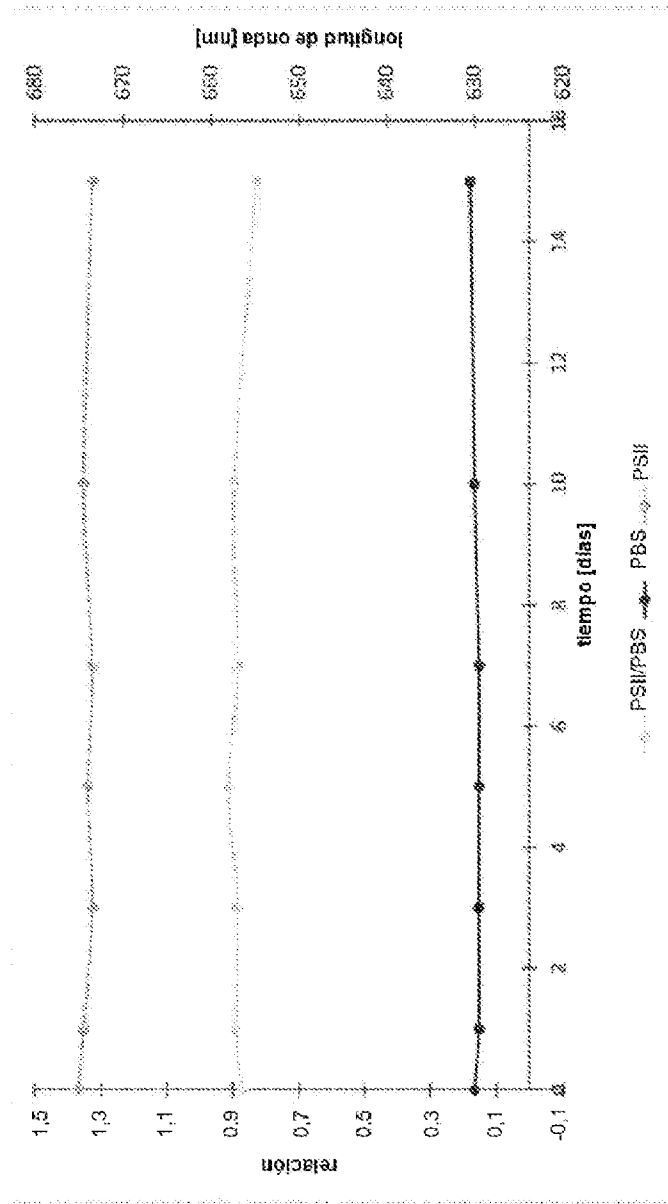


Fig. 8L

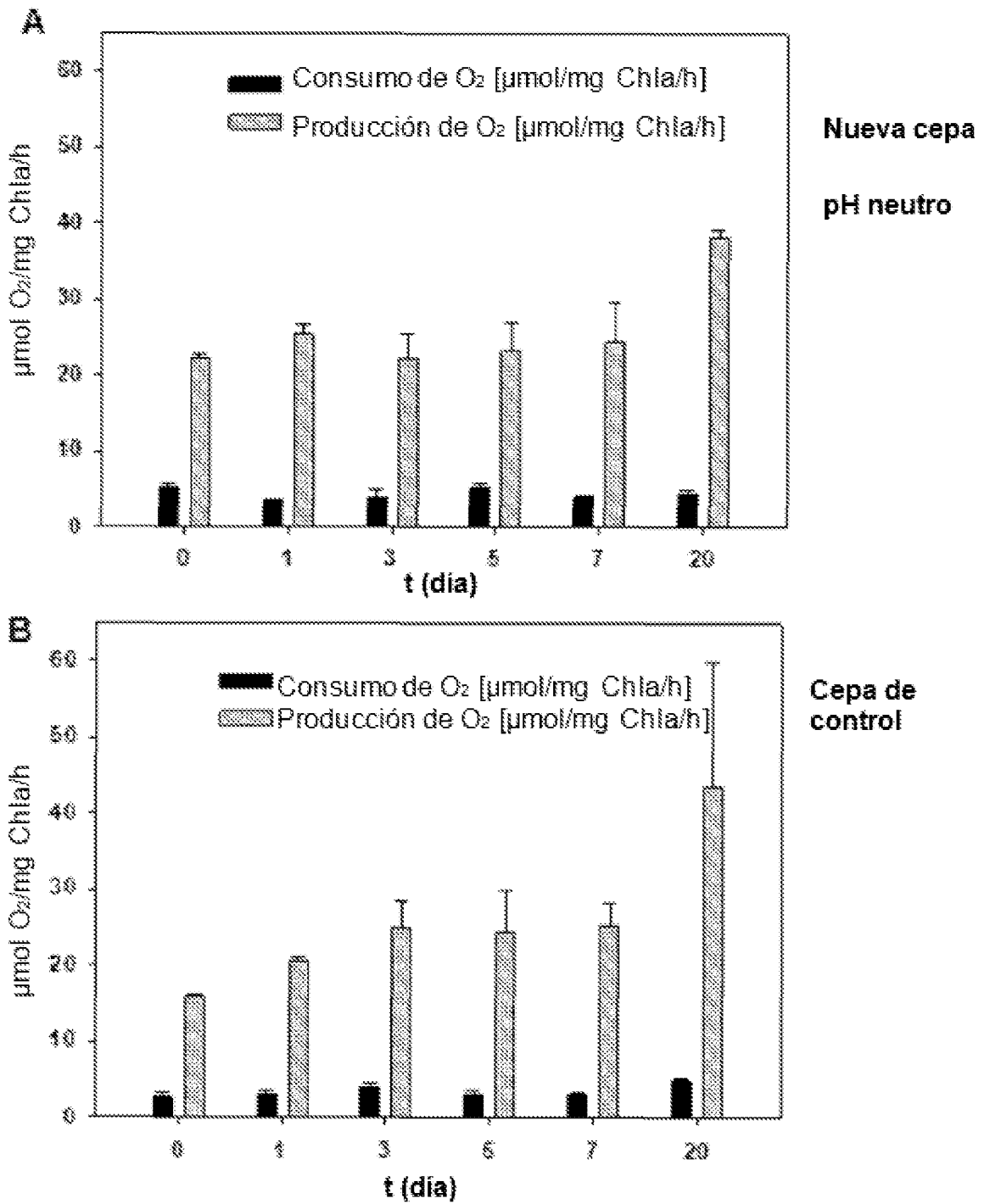


Fig. 9

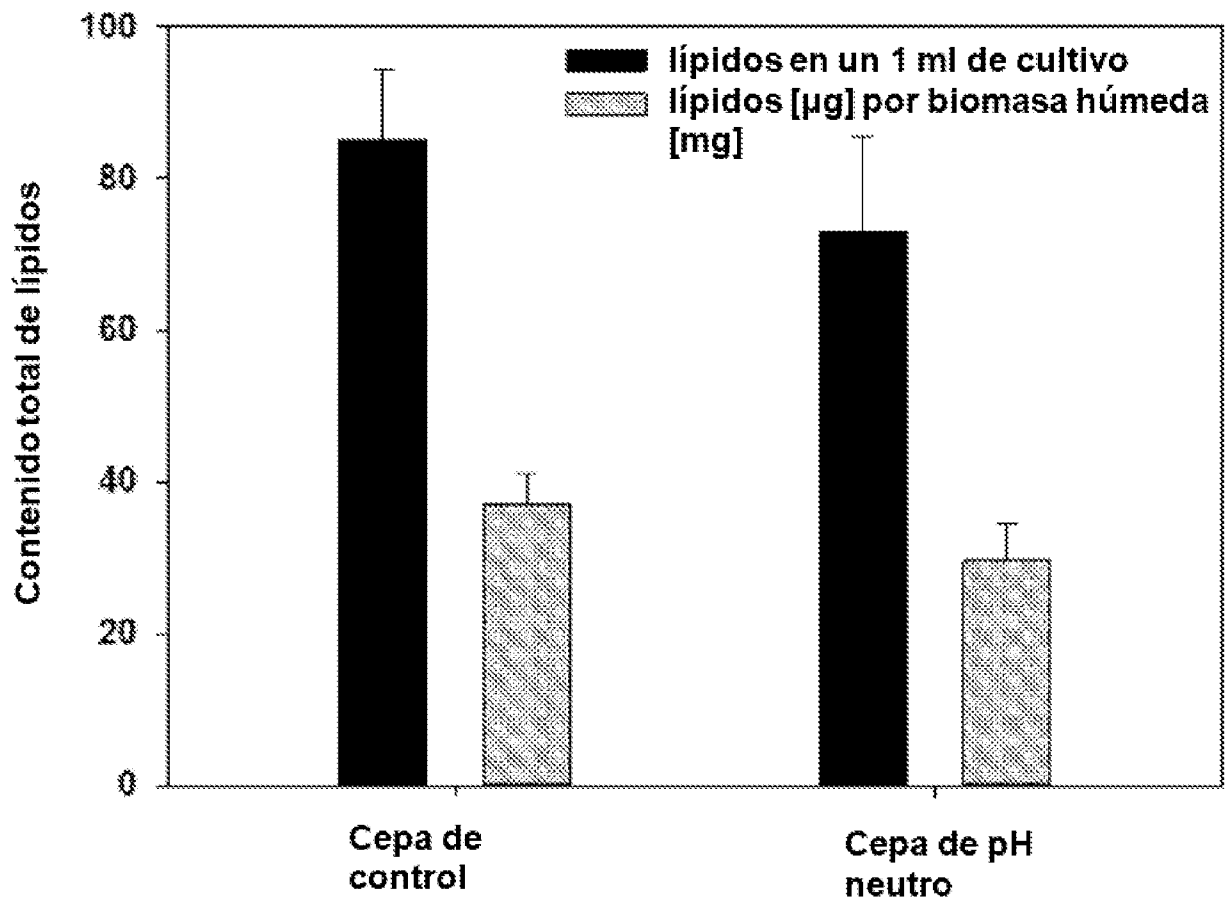


Fig. 10

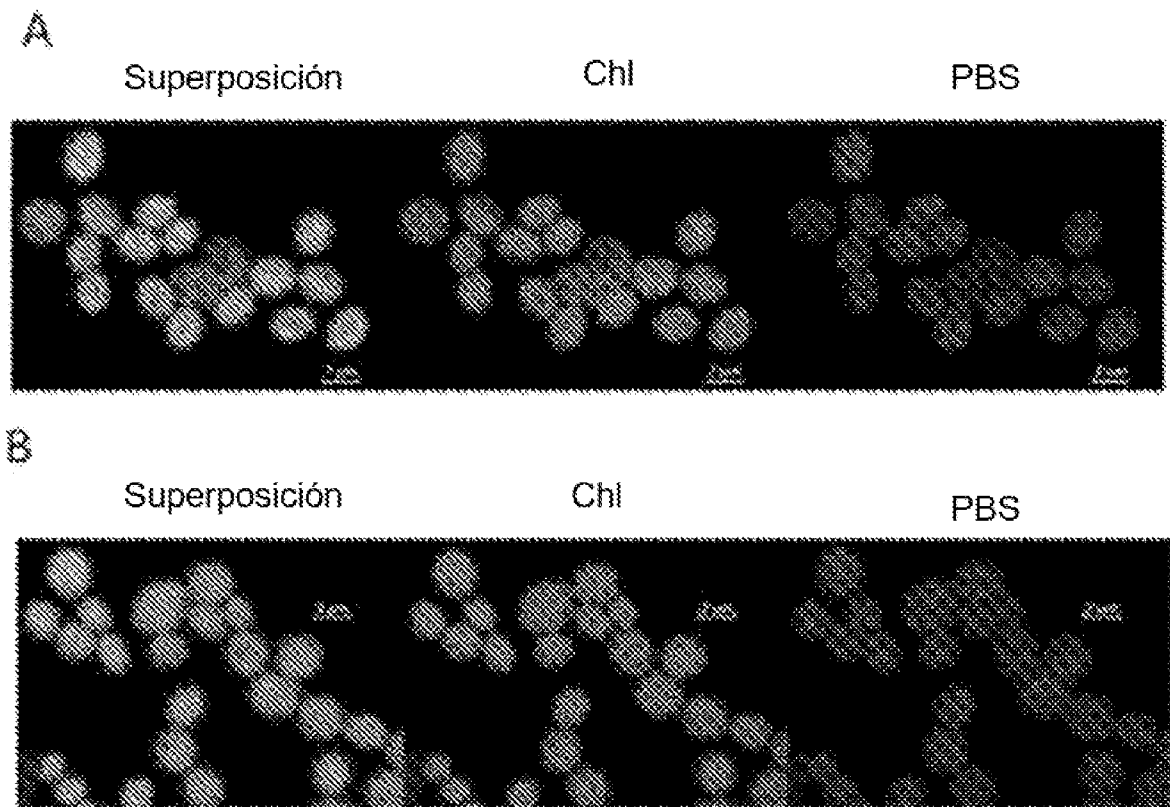


Fig. 11

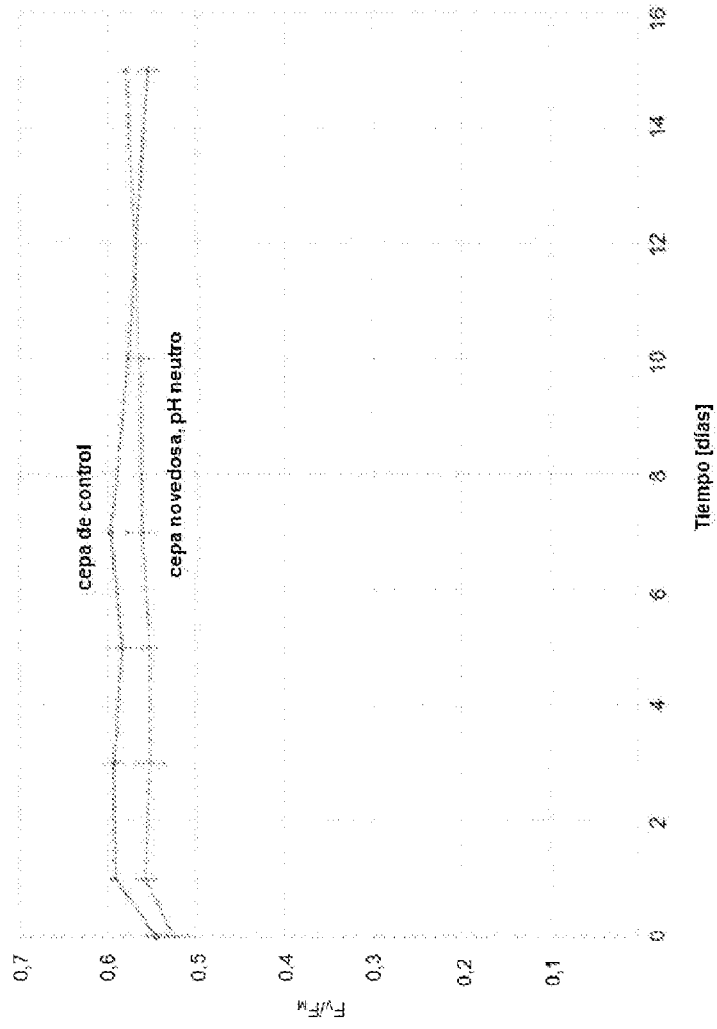


Fig. 12A

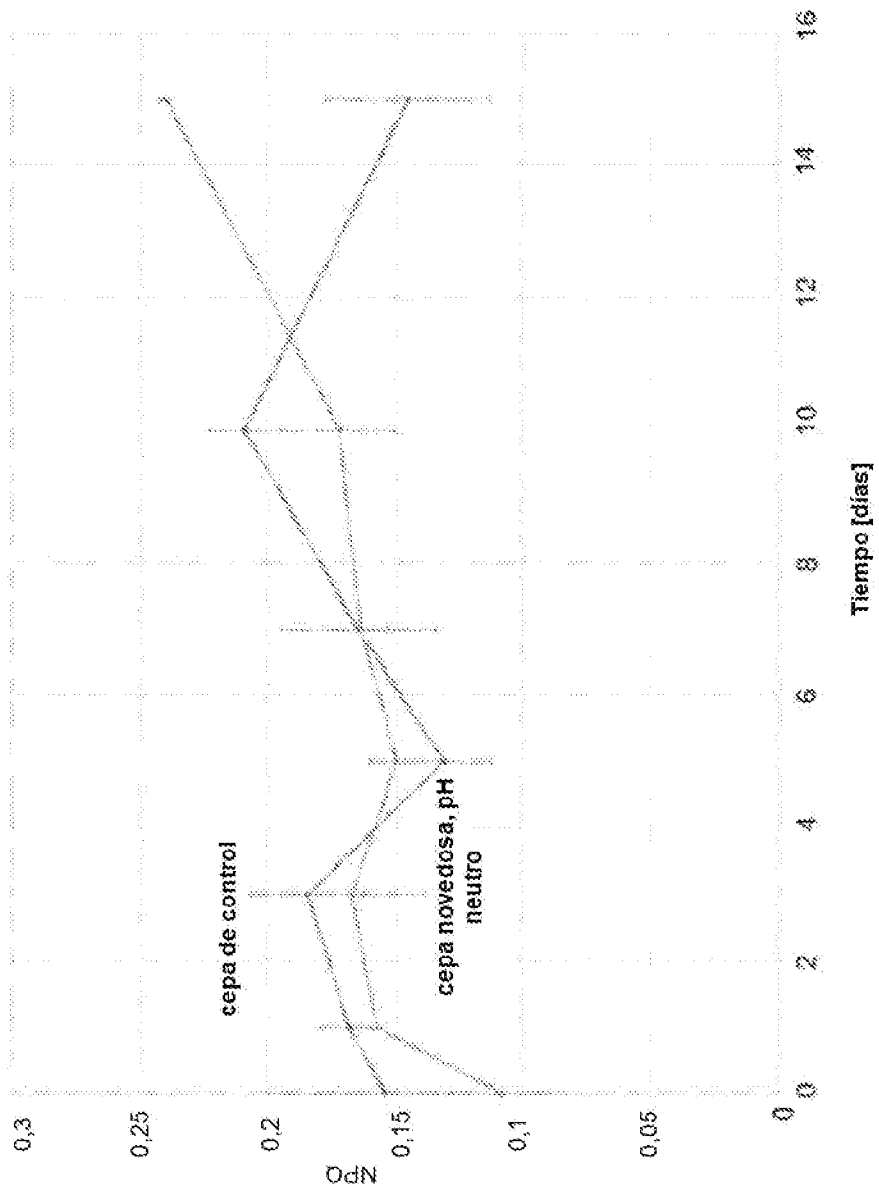


Fig. 12B.

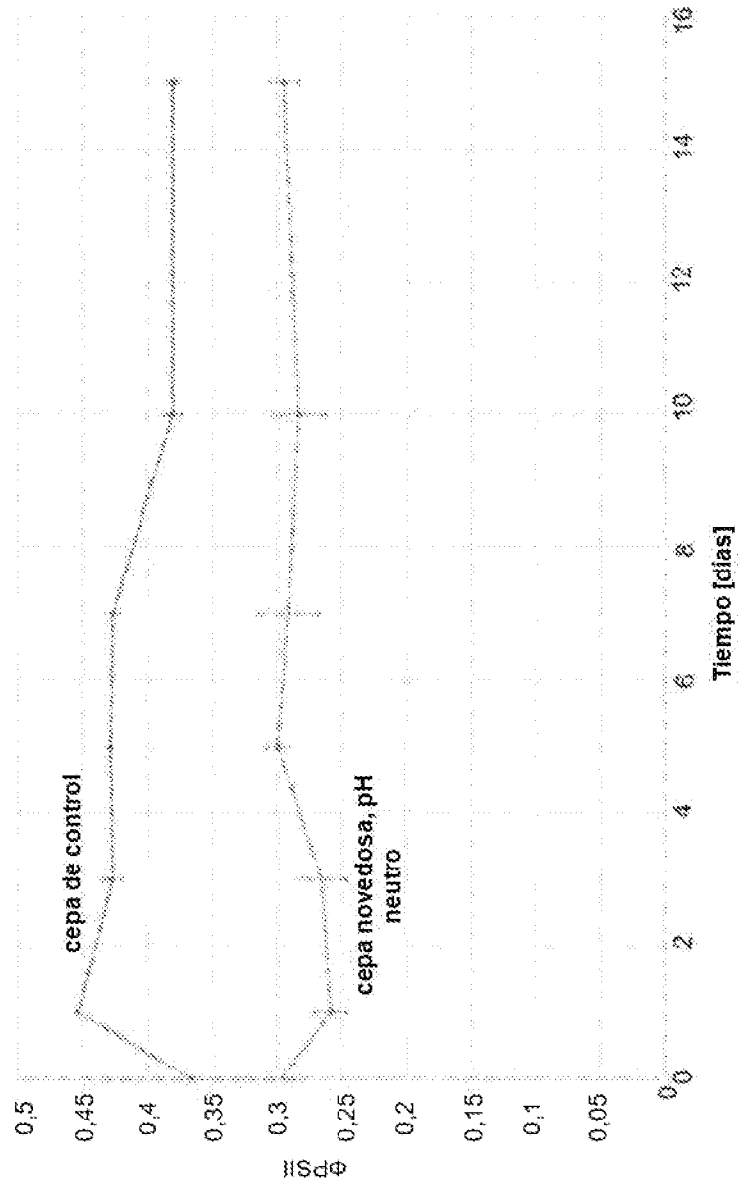


Fig. 12C