

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
18 de junio de 2020 (18.06.2020)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2020/122702 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:
C12N 1/12 (2006.01) *C12P 7/64* (2006.01)
C12N 13/00 (2006.01)

LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/MX2019/050030

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))
- en blanco y negro; la solicitud internacional se presentó en colores o en escala de grises y puede descargarse de PATENTSCOPE.

(22) Fecha de presentación internacional:
13 de diciembre de 2019 (13.12.2019)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
MX/a/2019/000561
14 de diciembre de 2018 (14.12.2018) MX

(71) Solicitante: **CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA (CICESE)** [MX/MX]; Carretera Ensenada - Tijuana 3918, Zona Playitas, Ensenada, Baja California, 22860 (MX).

(72) Inventor: **SÁNCHEZ SAAVEDRA, M. del Pilar**; Carretera Ensenada - Tijuana 3918, Zona Playitas, Ensenada, Baja California, 22860 (MX).

(74) Mandatario: **ALVAREZ DE LUCIO, Caritina Beatriz** et al.; Providencia 1552, Col. Tlacoquemecatl del Valle, Benito Juárez, Ciudad de México, 03200 (MX).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT,

(54) Title: METHOD FOR INCREASING THE PRODUCTION OF BIOMASS AND LIPIDS IN *CHLORELLA VULGARIS*

(54) Título: METODO PARA INCREMENTAR LA PRODUCCION DE BIOMASA Y DE LIPIDOS EN *CHLORELLA VULGARIS*

(57) Abstract: The invention relates to a method for increasing the production of biomass and fatty acids in the alga *Chlorella vulgaris* Beyerinck and obtaining a biomass rich in lipids of type C:16 (palmitic acid), C18:1n-9 (oleic acid), C18:2n-6t (linoleic acid) and C18:3n-3 (alpha-linoleic acid), which is used as a low-irradiance dichromatic light source.

(57) Resumen: Un método para incrementar la producción de biomasa y de ácidos grasos en el alga *Chlorella vulgaris* Beyerinck y obtener una biomasa rica en lípidos de tipo C:16 (palmítico), 5 C18:1n-9 (oleico), C18:2n-6t (linoléidico) y C18:3n-3 (alfa-linolénico), que usa una baja irradiancia de una fuente lumínica dicromática.

WO 2020/122702 A1

**METODO PARA INCREMENTAR LA PRODUCCION DE BIOMASA Y DE
LIPIDOS EN *CHLORELLA VULGARIS***

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere a un método para incrementar de forma controlada la producción de lípidos en el alga *Chlorella vulgaris* y más específicamente se refiere a un novedoso método para incrementar la producción de ácidos grasos en el alga *Chlorella vulgaris* Beyerinck (Beijerinck)
10 que permite obtener un aumento significativo de ácidos grasos del tipo C:16 (palmítico), C18:1n-9 (oleico), C18:2n-6t (linoléidico) y C18:3n-3 (alfa-linolénico), favoreciéndose además un incremento en la producción de biomasa del alga.

15 **Antecedentes de la Invención**

 Los cultivos de microalgas son una de las alternativas de generación de biomasa vegetal con mayor potencial de desarrollo, ya que no requieren de sustratos sólidos para su puesta en práctica. Asimismo, estos cultivos tienen la
20 ventaja de ser tan versátiles que pueden llevarse a cabo al aire libre o en reactores cerrados en los que se pueden controlar de mejor forma las condiciones del cultivo. Uno de los aspectos fundamentales a considerar al realizar estos cultivos, es eficientizar la producción de biomasa, esto es,
25 la cantidad en gramos de las células cosechadas respecto al volumen del medio líquido con nutrientes usado como sustrato de cultivo. La biomasa de las células de las microalgas varía en función del tamaño de las células y del peso seco orgánico (libre de cenizas).

30

 En el estado de la técnica se describen diversos métodos para producir cultivos de microalgas en los que el

rendimiento en la cantidad de la biomasa producida, depende de diversos factores como el tipo de sistema de cultivo, la magnitud de las variables ambientales entre las que se consideran principalmente la temperatura, la cantidad y la forma química de los nutrientes disponibles en medio, la salinidad, el pH, el tipo de especie de microalga y las condiciones de iluminación.

Los cultivos de microalgas son considerados una de las más prometedoras fuentes de biomasa para la obtención de biocombustibles, debido a que muchas especies tienen un rápido crecimiento y una alta producción de biomasa, así como un alto contenido de lípidos que puede ser utilizado para la producción de biodiésel. Por otra parte, las microalgas usan dióxido de carbono disuelto y pueden crecer en aguas residuales usando los nutrientes disponibles en las mismas, además de que pueden cultivarse en tierras no aptas para la agricultura [Christi, Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25(3):294-306].

20

Uno de los factores más significativos para alterar el metabolismo de las células de las microalgas es el tipo y tasa de exposición a la luz, lo cual se refiere a las horas de luz y de oscuridad (ciclo luz y oscuridad), a la cantidad de luz (irradiancia) y a la composición espectral de la luz (longitudes de onda o colores de la luz). La composición espectral de la luz en algunas especies de microalgas modifica el crecimiento, la producción de enzimas, la fotosíntesis y las rutas de síntesis metabólica [Voskresenskaya, N.P. (1972) Blue light and carbon metabolism. *Annual Review of Plant Physiology* 23(1):219-234.; de la Peña M.R. (2007) Cell growth and nutritive value

of the tropical benthic diatom, *Amphora* sp., at varying levels of nutrients and light intensity, and different culture locations. Journal of Applied Phycology 19:647-655; Vadiveloo, A., N.R. Moheimani, J.J. Cosgrove, P.A. Bahri, D. Parlevliet. (2015) Effect of different light spectra on the growth and productivity of acclimated *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). Algal Research 8:121-127].

Adicionalmente, durante el transcurso de un cultivo de microalgas, la disponibilidad de los nutrientes y de la luz tiende a disminuir, debido a que los nutrientes son usados para la producción de biomasa de las células y la luz disminuye debido al aumento en la densidad de células en suspensión. Por lo anterior, en los cultivos de microalgas durante la fase de crecimiento exponencial (cuando no hay limitación de luz y nutrientes) el crecimiento y la producción de biomasa son mayores que en la fase estacionaria del crecimiento (donde hay limitación de luz y/o nutrientes). Estos cambios en el crecimiento de las microalgas producen también modificaciones en la composición química de las células. Sin embargo, no todas las especies de microalgas responden de forma igual a las distintas variables medio ambientales y estas diferencias en su respuesta se deben a sus características fisiológicas, las cuales determinan su tasa de crecimiento, el tamaño de las células y la composición bioquímica. Estas diferencias en la fisiología de las microalgas se deben a una respuesta especie-específica, ya que, dependiendo del espectro lumínico incidente sobre el cultivo, se producen distintas cantidades y tipos de pigmentos que permiten a las microalgas captar la energía de la luz, de la que a su vez depende la actividad enzimática y por tanto, la producción de metabolitos celulares.

Se han llevado a cabo, distintos estudios para intentar identificar cómo el espectro lumínico incidente sobre los cultivos de microalgas, modifica el metabolismo celular. Por ejemplo, Kim et al. 2014 [Kim, D.G., Lee, C., Park, S.M. y Choi, Y.E. (2014) Manipulation of light wavelength at appropriate growth stage to enhance biomass productivity and fatty acid methyl ester yield using *Chlorella vulgaris*. Bioresource Technology 159:240-248] describen un estudio sobre el efecto de diversos tipos de lámparas LEDs (Light-emitting diodes) de color rojo (630-665 nm) y azul (430-465 nm) sobre el cultivo fototrófico de *Chlorella vulgaris* obtenida de la colección de UTEX en Texas, USA. El cultivo se realizó en medio JM en Erlenmeyer de 1000 ml a $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$, $100 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de luz continua y aireación de 110 ml min^{-1} . Los resultados mostraron que la luz azul incrementó el tamaño celular y que la luz roja disminuye el tamaño de las células, pero activa la división celular. Los autores proponen el uso alternativo de iluminación de los cultivos con luz azul y luz roja para fomentar el crecimiento y la producción de lípidos respecto al tratamiento control (luz blanca). En luz azul obtienen células de tamaño de entre 4.5 y 6.0 μm , en luz roja de entre 1.8 a 4.0 μm y en luz blanca de entre 2.8 a 5.0 μm . La producción de biomasa como peso seco fue para luz azul de 0.020 ng célula⁻¹ y para luz roja de entre 0.15 a 0.22 ng célula⁻¹. En dicho estudio se describen los valores solo para algunos componentes del perfil de ácidos grasos y su efecto por cambio del tipo de iluminación a diferente número de días en luz azul y roja en los que obtienen para C10:0 (0.51 a 1.51%), C14:0 (1.11 a 1.63%), C16:0 (14.38 a 15.53%), C17:1 (11.23 a 12.28%), C18:0 (3.7 a 7.21%), C18:2 (7.76 a 10.33%) y C18:3 (29.7 a 33.47%).

Blair et al. 2014 [Blair, M.F., Kokabian, B. y Gude, V.G., (2014) Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production. Journal of Environmental Chemical Engineering 2(1):665-674] describen un estudio
5 acerca del efecto de distintas longitudes de onda de luz incidente (azul, blanca, verde, roja) y la composición del medio de cultivo sobre el crecimiento de microalgas. En dicho estudio utilizaron una cepa de *Chlorella vulgaris* obtenida de Connecticut Valley Biological Supply Co. Inc.,
10 Southampton, MA. El medio de cultivo usado fue Bold basal (BBM) y los cultivos se mantuvieron en reactores de 6 L a 276 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, con agitación constante de 100 rpm a una temperatura controlada de 25°C. Los experimentos se realizaron en 3 fases: 1) el efecto de diferentes longitudes
15 de onda; 2) el efecto del medio a 25%, 50% y 100% de la composición sugerida y; 3) el efecto de la concentración de nutrientes (nitrógeno y fósforo). Los resultados mostraron que la luz azul produce mayores tasas de crecimiento y producción de biomasa comparativamente a lo obtenido en luz
20 blanca, roja y verde. Se encontró que por efecto del medio de cultivo la concentración de 50% respecto a la composición sugerida es la que brinda un mayor crecimiento. Los valores de producción de biomasa al día 2 resultaron para luz blanca en 0.02 g L⁻¹ día⁻¹, para luz roja 0.005 g L⁻¹ día⁻¹, para
25 luz azul 0.012 g L⁻¹ día⁻¹ y para luz verde 0.01 g L⁻¹ día⁻¹.

Daliry et al. 2017 [Daliry, S., Hallajisani, A., Roshandeh, J.M., Nouri, H., Golzary, A. (2017) Investigation of optimal condition for *Chlorella vulgaris* microalgae
30 growth. Global Journal of Environmental Science and Management 3(2):217-230], es un trabajo de revisión bibliográfica en donde se describe el comportamiento del

cultivo de *Chlorella vulgaris* al ser mantenido en distintas condiciones ambientales. Se menciona que los cultivos son más eficientes cuando la fuente de nitratos se encuentra en una concentración de entre 20 a 0.5 g L⁻¹, el pH se fija
5 entre 9 a 10, la iluminación es discontinua de entre 5 y 7 Klux y, se instaura un flujo de aireación de 200 ml min⁻¹. La mayor producción de biomasa obtenida fue de 3.43 g L⁻¹ y la mejor producción de lípidos fue de 66.25 mg L⁻¹ día⁻¹. Tomado del trabajo de Kim et al. (2014), describen los
10 cambios en el tamaño de las células de *Chlorella vulgaris* al ser expuesta en luz azul la cual incrementa entre un 60 a 70% el diámetro respecto a la luz roja y que la producción de biomasa cambia en dependencia de los días de exposición a luz roja o azul.

15

Pérez-Pazos et al. 2011 [Pérez-Pazos, J.V., Fernández-Izquierdo, P. (2011) Synthesis of neutral lipids in *Chlorella* sp. under different light and carbonate conditions. CT&F-Ciencia, Tecnología y Futuro 4(4):47-58] describen el uso de
20 una especie de *Chlorella* sp. que es una microalga silvestre catalogada como LAUN0016 y que fue crecida en medio Bold's Basal (BBM), mantenida en fotobioreactores con luz blanca a 20°C, aireación constante y un fotoperiodo de 12/12 horas de luz y oscuridad. En el trabajo se usan distintas condiciones
25 experimentales en un diseño factorial en donde usan luz roja (700 nm) y azul (500 nm), 2 concentraciones de CaCO₃ (0.5 y 1.5 g L⁻¹) y 2 fotoperiodos (18:6 y 6:18) de horas de luz y oscuridad. Los resultados muestran que la mayor tasa de crecimiento se obtuvo con luz roja, con 0.5 g L⁻¹ CaCO₃ y
30 6:18 de fotoperiodo (0.1090±0.0014), mientras que la mayor producción de lípidos ocurre con luz azul 1.5 g L⁻¹ CaCO₃ y 18:6 de fotoperiodo (0.7783±0.0219 g L⁻¹). En el Artículo

muestran un cromatograma, pero no calculan el porcentaje de lípidos para cada tipo de ácido graso en las distintas condiciones experimentales. Los autores describen los efectos del uso de luz azul y roja, pero solo indican la longitud de onda pico para cada caso; sin embargo, no indican el tipo de lámpara y tampoco las características espectrales de la luz utilizada para los ensayos.

Sánchez-Saavedra et al. 1996 [Sánchez-Saavedra, M.P., Jiménez, C., Figueroa, F.L. (1996) Far-red light inhibit growth but promotes carotenoid accumulation in the green microalgae *Dunaliella bardawil*. *Physiologia Plantarum* 95:419-423] describen un estudio con *Dunaliella bardawil*, en donde los cultivos fueron expuestos a un gradiente de irradiancia de 50 a 300 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de luz blanca y luz rojo lejano, se encontró que para ambos tipos de iluminación la densidad de células y la tasa de crecimiento incrementaron en relación directa al aumento de la irradiancia. La tasa de crecimiento fue significativamente menor con la luz rojo lejano (en el gradiente de irradiancia) con respecto a la luz blanca, sin embargo, se encontró que la producción de carotenoides se incrementó hasta un 50% (en base al peso seco) y que se obtuvo un aumento del tamaño celular por efecto de la luz rojo lejano respecto a los valores menores obtenidos con luz blanca.

Finalmente, Chávez-Fuentes et al. (2018) [Chávez-Fuentes, P., Ruiz-Marin, A., Y. Canedo-López. 2018. Biodiesel synthesis from *Chlorella vulgaris* under effect of nitrogen limitation, intensity and quality light: estimation on the based fatty acid profiles. *Molecular Biology Reports* <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4266-9>] divulga que en

ensayos realizados con *Chlorella vulgaris*, expuesta a un efecto de limitación de nitrógeno y de la composición espectral de la luz respecto a la composición de ácidos grasos, se encontró una mayor producción de biomasa y densidad celular en la irradiancia de luz a $140 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, en luz blanca y luz azul comparado con luz violeta y amarilla. En dicho documento también se menciona que a causa de la composición espectral de la luz, no se encontró un efecto negativo en la producción de lípidos para uso como biocombustibles. En la composición de ácidos grasos el principal componente fue de C12:0 (ácido láurico) en valores entre 53.09 para luz azul en irradiancia de $140 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y de 80.33 y 80.86 en luz blanca y violeta mantenidos con $70 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ respectivamente. Estos valores de ácidos grasos indicados para *Chlorella vulgaris* por Chávez-Fuentes et al. (2018) son muy diferentes a los publicados en la literatura del área aún en las condiciones estándar de producción en luz blanca.

Si bien en los Artículos antes mencionados, se describe que el tipo de luz incidente puede modificar la respuesta metabólica de las microalgas y en particular se indica que es uno de los parámetros críticos en la producción de metabolitos, ninguno de ellos permite tener un panorama claro de los efectos de la radiación incidente en la producción de compuestos específicos. Asimismo, en dichos Artículos, los estudios se centran en especies de microalgas específicas y la irradiancia utilizada es alta por lo que los cultivos obtenidos tendrían dificultades para ser escalados a nivel industrial, toda vez que los requerimientos de estos son muy excesivos. Aunado a ello, si bien las algas estudiadas resultan ser de las más prometedoras para la obtención de

grandes cantidades de biomasa, el perfil de producción de lípidos obtenido en los documentos antes citados no es el más indicado para que la biomasa obtenida pueda ser usada en procesos de obtención de biodiesel.

5

En vista de la problemática anterior, existe la necesidad de proporcionar una metodología específica capaz de modificar el comportamiento metabólico del alga *Chlorella vulgaris* Beyerinck, la cual es una de las microalgas más
10 idóneas para ser usada en la producción de biomasa destinada a procesos de obtención de biocombustibles, que favorezca la producción de ácidos grasos con un alto índice de cetano (CN). Asimismo, existe la necesidad de proveer una metodología de cultivo en la que se disminuya
15 significativamente los requerimientos de poder lumínico incidente para así favorecer la implementación del método a gran escala, al mismo tiempo que se controle el tipo de lípidos producidos para así obtener una biomasa con un perfil de compuestos lipídicos controlados y reproducibles.

20

Sumario de la Invención

Con el fin de superar las desventajas de los métodos convencionales de cultivo para microalgas, la presente invención tiene por objetivo de proveer una nueva metodología
25 de cultivo específica que permita incrementar la producción de ácidos grasos en el alga *Chlorella vulgaris* Beyerinck, sin que sea necesario modificar las condiciones basales del medio de cultivo.

30

Un objetivo particular de la presente invención es el proporcionar un método de cultivo específico para el alga *Chlorella vulgaris* Beyerinck que permita obtener un

incremento significativo de la producción de lípidos del tipo C:16 (palmítico), C18:1n-9 (oleico), C18:2n-6t (linoléidico) y C18:3n-3 (alfa-linolénico).

5 Otro objetivo de la presente invención es el de proporcionar un método para incrementar la producción de ácidos grasos en el alga *Chlorella vulgaris* Beyerinck, que use un poder de irradiancia bajo y que además permita incrementar la biomasa producida.

10

Un objetivo adicional de la presente invención es el de proporcionar un método para incrementar la producción de ácidos grasos en el alga *Chlorella vulgaris* Beyerinck, que permita obtener una biomasa con una alta proporción de
15 lípidos que pueda ser usada en procesos de obtención de biocombustibles.

Los objetivos antes citados, así como otros y las ventajas de la presente invención, vendrán a ser aparentes
20 de la siguiente descripción detallada de la misma.

Descripción Detallada de la Invención

La presente invención proporciona un novedoso método para incrementar la producción de ácidos grasos en el alga
25 *Chlorella vulgaris* Beijerinck, en particular para incrementar la producción de lípidos de tipo C:16 (palmítico), C18:1n-9 (oleico), C18:2n-6t (linoléidico) y C18:3n-3 (alfa-linolénico); al mismo tiempo que se incrementa el rendimiento del cultivo obteniéndose una
30 biomasa mayor.

El método de la presente invención permite controlar el

metabolismo del alga *Chlorella vulgaris* Beyerinck, a fin de favorecer la producción de ácidos grasos del tipo C:16 (palmítico), C18:1n-9 (oleico), C18:2n-6t (linoléidico) y C18:3n-3 (alfa-linolénico), sin que sea necesario modificar de ninguna forma las condiciones basales de los medios de cultivo convencionales del alga. Para ello el método de la presente invención usa fuentes de iluminación dicromáticas de baja intensidad con longitudes de onda específicas aplicadas en fases de crecimiento concretas, que permiten modificar el comportamiento metabólico basal del alga de forma que se favorece la producción de los ácidos grasos antes mencionados.

El método de la presente invención comprende los siguientes pasos secuenciales:

1.- Adicionar un inóculo del alga *Chlorella vulgaris* Beyerinck en fase exponencial de crecimiento, a un medio de cultivo "f" [(Guillard, R.R.L., Ryther, J.H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (CLEVE) Gran. Canadian Journal of Microbiology, 8(2):229-239)], preparado con agua dulce a pH de entre 7.3 y 8.0, hasta obtener una concentración de entre 0.4 a 0.5 x 10⁶ células ml⁻¹;

25

2.- Iluminar la solución del paso 1 con una fuente lumínica dicromática con picos de emisión de 450 nm y 625 nm, a una irradiancia de 50 μ mol fotón m⁻² s⁻¹, de forma continua en ciclos de luz/oscuridad de 24:0, manteniendo el cultivo a una temperatura de entre 20°C y 22°C por un periodo de tiempo de entre 48 y 72 horas hasta obtener una densidad de células de entre 0.95 a 1.05 X 10⁶ células ml⁻¹;

30

3.- Centrifugar la biomasa obtenida entre 3800 y 4200 rpm, por 5 a 10 min a una temperatura de entre 4°C y 6°C y;

4.- Liofilizar la biomasa centrifugada a -50°C y a una
5 presión de 0.11 bar para obtener células secas de *Chlorella vulgaris* Beyerinck con un alto porcentaje de ácidos grasos.

Con el método antes descrito se obtiene una biomasa seca que tiene células completas de *Chlorella vulgaris* Beyerinck
10 con una producción de biomasa promedio de 57.2 pg célula⁻¹. Esta biomasa obtenida tiene un contenido de lípidos totales del 18% en la fase exponencial y 11% en la fase estacionaria, siendo el contenido de lípidos de C:16 de 12.47% en la fase exponencial y 19.71% en la fase estacionaria, C18:1n-9 de
15 12.09% en la fase exponencial y 23.23% en la fase estacionaria, C18:2n-6t de 12.04% en la fase exponencial y 10.42% en la fase estacionaria y C18:3n-3 de 36.31% en la fase exponencial y 25.89 en la fase estacionaria. Dicho contenido de lípidos, así como su tipo permiten usar la
20 biomasa obtenida como materia prima de procesos convencionales de obtención de biocombustibles dado que el tipo de lípidos obtenidos presentan el mejor perfil para ser usados como materia de partida de procesos de obtención de aceites de alto índice de cetano. Asimismo, debido a que no
25 se usan ningún tipo de hormonas aceleradoras de crecimiento ni se incluyen compuestos tóxicos en el medio de cultivo, la biomasa obtenida puede usarse en la fabricación de piensos animales o de suplementos destinados al consumo humano. Además de lo anterior, al no usarse cepas con modificaciones
30 genéticas de *Chlorella vulgaris* Beyerinck, se garantiza la seguridad ambiental e inocuidad de la biomasa obtenida.

La biomasa obtenida por la metodología antes descrita es perfectamente susceptible de ser usada en procesos de obtención de biodiesel ya que se obtienen ácidos grasos con alto grado de saturación (SFAs) como el caso del C16:0 con una concentración porcentual en fase exponencial de 12.47 ± 0.15 y en la fase estacionaria de 19.71 ± 0.73 , los cuales muestran alto valor de número de cetano (CN = 74.5), altos valores de punto de fusión (62.9°C), alto punto de ebullición (351.0°C) y baja densidad (0.85 g cm^{-3}). El número de cetanos (CN) es uno de los indicadores que describen la calidad de la combustión del biodiesel durante el proceso de ignición. En particular en la ingeniería de biodiesel, un valor alto de CN en los combustibles tiene cortos procesos de retardo de la ignición respecto a los valores bajos de CN (Knothe, 2005). [Knothe, G. (2005) Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. Fuel. Process Technol. 86(10):1059-1070]. El CN y la calidad de la ignición están inversamente relacionados por medio de una función logarítmica negativa respecto al grado de saturación de los ácidos grasos (Knothe et al., 2003) [Knothe. G., Matheaus, A.C., Ryan T.W. (2003) Cetane numbers of branched and straight-chain fatty esters determined in an ignition quality tester. Fuel 82(8):971-975]. Los ácidos grasos saturados (SFAs) que se producen con el método antes descrito, tiene altos valores de CN y estabilizan la combustión con bajas emisiones, son resistentes a la degradación y en consecuencia incrementan la longevidad del biodiesel obtenido, también incrementan la resistencia a la oxidación en lugares con climas cálidos, por lo que la biomasa obtenida por la metodología antes descrita puede ser usada en procesos de obtención de biodiesel convencionales.

La biomasa obtenida por el método de la presente invención también puede ser usada como suplemento alimenticio, ya que el tipo y proporción de los ácidos grasos obtenidos la vuelven un candidato idóneo como materia prima de partida de la obtención de piensos y complementos. Por medio de la metodología de la presente invención, se obtiene una biomasa rica en ácidos grasos saturados que son estables a la oxidación como resultado de la saturación de los dobles enlaces de carbón, por lo que esta biomasa puede usarse para aportar características importantes en la estabilidad de los alimentos. Por ejemplo, el ácido graso palmítico es usado en la dieta de humanos y constituye cerca del 60% de su dieta, su aporte es principalmente de carnes y grasas animales (mantequilla, queso, nata) así como de vegetales como la palma (44%) y semillas (8 a 20%) [Carta, G., E. Murru, S. Banni, C. Manca. 2017. Palmitic acid:physiological role metabolism and nutritional implications. Front. Physiol. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00902>]. Por otro lado, el ácido graso oleico es usado como hipotensor y previene el desarrollo de problemas cardiovasculares y ayuda al control de colesterol y lipoproteínas de alta densidad (HDL) [Pérez-Rosales, R., Villanueva-Rodríguez S., Cosío-Ramírez, R. 2005. El aceite de aguacate y sus propiedades nutricionales. E-Gnosis 3(10): 11 pp.].

25

A fin de evidenciar las ventajas técnicas del método antes mencionado, se muestra a continuación un ejemplo de la puesta en práctica de la presente invención.

30

Ejemplo 1. Cultivo del alga *Chlorella vulgaris* Beyerinck bajo la metodología de la presente invención.

Se inició un cultivo madre monoespecífico de células de *Chlorella vulgaris* Beyerinck (Beijerinick) 1890 obtenidas de la colección de microalgas del "Institute of Applied Microbiology (IAM)" de la Universidad de Tokyo, Bunkyo-Ku,
5 Tokyo, Japón.

Se tomaron células de los cultivos madre en fase de crecimiento exponencial y se transfirieron a matraces Erlenmeyer que contenían medio "f" de cultivo (Guillard y
10 Ryther, 1962), preparado con agua dulce, cuya composición se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Composición del medio "f" de cultivo.

Compuesto	Concentración
NaNO ₃	150 mg
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	10 mg
Quelato de Fe	10 mg
Na ₂ SiO ₃ •9H ₂ O	30-60 mg
Tiamina•HCl	0.2 mg
Biotina	1.0 mg
B12	1.0 mg
CuSO ₄ •5H ₂ O	0.0196 mg
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0.044 mg
CoCl ₂ •6H ₂ O	0.020 mg
MnCl ₂ •4H ₂ O	0.360 mg
NaMoO ₄ •2H ₂ O	0.0126 mg
Agua	cbp 1 L

15 Los cultivos se iniciaron con una densidad de células promedio de entre 0.40 a 0.42 x 10⁶ células ml⁻¹, y se irradiaron con una fuente de luz dicromática con picos de emisión en 450 nm y 625 nm, por fotoperiodos de luz y oscuridad de 24:0 de forma continua, manteniendo la
20 temperatura de los cultivos a 21±1°C y a pH entre 7.3 y 8.0, con agitación manual de 1 minuto cada 24 horas.

La densidad celular se midió diariamente por conteos directos con hemocitómetro y microscopio compuesto y se valoró el tamaño de las células midiendo aleatoriamente el diámetro celular.

5

La evaluación de la cantidad de la biomasa producida de *Chlorella vulgaris* Beyerinck se realizó por medio de colecta de una alícuota de los cultivos en filtros de fibra de vidrio (GF/C) con abertura de poro de 1 μm , el filtro se enjuagó con formiato de amonio (3%) para eliminar residuos de sales. El peso seco total (TDW) se obtuvo al mantener los filtros en una estufa a 60°C hasta tener peso constante. El contenido de cenizas (AC) se obtuvo al incinerar los filtros en una mufla a 450°C por 12 h para posteriormente obtener el peso de la muestra. El contenido del peso seco orgánico (ODW) se calculó al sustraer del valor del peso seco total del peso de las cenizas (ODW=TDW-AC).

La producción de biomasa por célula se calculó relacionando el peso orgánico de la muestra y la densidad de células. La producción diaria de biomasa (PDB) se obtuvo al relacionar el peso seco orgánico con el tiempo de cultivo.

El contenido de lípidos de los cultivos de *Chlorella vulgaris* Beyerinck se obtuvo al coleccionar una alícuota de un volumen de los cultivos en filtros de fibra de vidrio (GF/C) con abertura de poro de 1 μm . Los lípidos se extrajeron al macerar la muestra y usar cloroformo, metanol y agua (2:2:1). La cuantificación se realizó siguiendo el método con ácido sulfúrico. El contenido de lípidos se expresó como porcentaje en base al peso seco orgánico de la muestra. Como estándar para la curva de calibración se utilizó tripalmitina (99%).

30

Para obtener el perfil de ácidos grasos, la biomasa de células de *Chlorella vulgaris* Beyerinck se cosechó por centrifugación a 4000 rpm, por 5 a 10 min y a 4°C. La biomasa húmeda de las células de *Chlorella vulgaris* Beyerinck se liofilizó a -50°C y una presión de 0.110 bar hasta obtener biomasa seca. La extracción de los lípidos de las células de *Chlorella vulgaris* Beyerinck se realizó por métodos gravimétricos en frío usando cloroformo para la extracción. Se realizó una metilación y el perfil de ácidos grasos se analizó por cromatografía de gases. Para la identificación de los ácidos grasos se tomó en consideración el tiempo de retención de un estándar comercial de ácidos grasos.

Todas las valoraciones se llevaron a cabo en fase de crecimiento exponencial (E) día 2 y estacionaria (S) día 8. Los resultados de las valoraciones de los cultivos se muestran a continuación:

Tabla 2. Tasa de crecimiento (μ : divisiones día-1), máxima concentración de células (MCD: x 10⁶ células ml-1), peso seco total (TDW: pg célula-1), peso seco orgánico (ODW: pg célula-1), tamaño celular (TC: μ m) y valores de producción diaria de biomasa (PDB: g L-1 día-1) para *Chlorella vulgaris* Beyerinck en fase de crecimiento: exponencial (E) y estacionaria (S).

		TDW		ODW		TC		PDB	
μ	MCD	E	S	E	S	E	S	E	S
		0.47±2.29±	80.90±	68.51±	57.20±	68.51±	14.95±	14.86±	0.065±

0.04b 0.15 3.37 5.99 0.82 5.99 2.94 2.40 0.001 0.001

Tabla 3. Contenido de lípidos (%) de *Chlorella vulgaris* Beyerinck en dos fases de crecimiento: exponencial (E) y estacionaria (S).

Lípidos	
E	S
18.35±0.25	11.27±0.70

5

Tabla 4. Composición de ácidos grasos (en base al porcentaje del total de ácidos grasos) de *Chlorella vulgaris* Beyerinck cultivada en dos fases de crecimiento: exponencial y estacionaria.

Tipo de lípido	Fase de crecimiento			
	Exponencial		Estacionaria	
Ácidos grasos saturados (SFA)				
C6:0	0.13	±0.01	0.15	±0.01
C8:0	0.49	±0.03	0.36	±0.02
C10:0	3.61	±0.10	3.02	±0.12
C11:0	0.96	±0.03	1.06	±0.03
C12:0	0.13	±0.01		
C13:0	1.89	±0.08	1.56	±0.05
C14:0	0.38	±0.01	0.38	±0.01
C15:0	0.18	±0.00	0.19	±0.01
C16:0	12.47	±0.15	19.71	±0.73
C17:0	0.19	±0.01	0.23	±0.02
C18:0	1.74	±0.10	2.09	±0.03
C20:0	0.21	±0.01	0.30	±0.03
C21:0				
C24:0	0.11	±0.01	0.07	±0.00
Ácidos grasos monosaturados (MUFA)				
C14:1	0.43	±0.02	0.33	±0.01
C15:1	0.33	±0.02	0.08	±0.01
C16:1	9.25	±0.48	8.13	±0.05
C17:1	6.18	±0.22	1.56	±0.09
C24:1	0.06	±0.00	0.09	±0.00
C18:1n-9	12.09	±0.13	23.23	±0.41
C20:1n-9	0.11	±0.01	0.30	±0.00
C22:1n-9	0.18	±0.01	0.38	±0.01
Ácidos grasos poliinsaturados (PUFA)				
C18:2n-6c	0.19	±0.01	0.09	±0.00
C18:2n-6t	12.04	±0.11	10.42	±0.09
C18:3n-6	0.19	±0.00	0.10	±0.01
C18:3n-3	36.31	±0.73	25.89	±0.81
C20:2			0.08	±0.01
C20:3n-3	0.08	±0.00	0.12	±0.00
C20:4n-6				
C20:5n-3	0.06	±0.00	0.08	±0.00
TOTAL	100.00		100.00	

Los resultados anteriores muestran de forma inequívoca que, con la metodología de la presente invención, se puede

incrementar la proporción de ácidos grasos producidos por *Chlorella vulgaris* Beyerinck obteniéndose un perfil lipídico apto para ser usado como materia de partida de procesos de obtención de biodiesel y con altos valores de índice de
5 cetano.

La presente invención se ha descrito de acuerdo con una de sus modalidades preferidas; sin embargo, será aparente para un técnico con conocimientos medios en la materia, que
10 podrán hacerse modificaciones a la invención, sin apartarse de su espíritu y alcance.

REIVINDICACIONES

1.- Un método para incrementar la producción de ácidos grasos en *Chlorella vulgaris* Beyerinck y obtener una biomasa del alga con un porcentaje elevado de lípidos de C:16, C18:1n-9, C18:2n-6t y C18:3n-3 caracterizado porque comprende los pasos de:

1) adicionar un inóculo del alga *Chlorella vulgaris* Beyerinck en fase exponencial de crecimiento, a un medio de cultivo "f", preparado con agua dulce a pH de entre 7.3 y 8.0, hasta obtener una concentración de entre 0.4 a 0.5 x 10⁶ células ml⁻¹;

2) iluminar la solución del paso 1 con una fuente lumínica dicromática con picos de emisión de 450 nm y 625 nm, a una irradiancia de 50 μmol fotón m⁻² s⁻¹, de forma continua en ciclos de luz/oscuridad de 24:0, manteniendo el cultivo a una temperatura de entre 20°C y 22°C por un periodo de tiempo de entre 48 y 72 horas hasta obtener una densidad de células de entre 0.95 a 1.05 X 10⁶ células ml⁻¹;

3) centrifugar la biomasa obtenida a entre 3800 y 4200 rpm, por 5 a 10 min a una temperatura de entre 4°C y 6°C y;

4) liofilizar la biomasa centrifugada a -50°C y a una presión de 0.11 bar para obtener células de *Chlorella vulgaris* Beyerinck con un contenido de lípidos totales del 18%, de lípidos de C20 del 31%, de lípidos de C16 del 17% y de lípidos de C18:1n9t del 20.63%.

2.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el medio de cultivo "f" comprende 150 mg de NaNO₃; 10 mg de NaH₂PO₄·H₂O; 10 mg de quelato de Fe; entre 30 a 60 mg de Na₂SiO₃·9H₂O; 0.2 mg de tiamina·HCl; 1.0 mg de biotina; 1.0 mg de B12; 0.0196 mg de CuSO₄·5H₂O; 0.044 mg de ZnSO₄·7H₂O; 0.020 mg de CoCl₂·6H₂O; 0.360 mg de

MnCl₂•4H₂O; 0.0126 mg de NaMoO₄•2H₂O y; Agua cbp 1L.

3.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el cultivo del paso 2) se mantiene a una temperatura de 21°C y el pH entre 7.3 y 8.0, con agitación
5 manual de 1 minuto cada 24 horas.

4.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la centrifugación del paso 3 se lleva a cabo a 4000 rpm y a una temperatura de 4°C.

5.- El método de acuerdo con la reivindicación 1,
10 caracterizado porque las células de *Chlorella vulgaris* Beyerinck liofilizadas tienen un perfil de lípidos en base al porcentaje total de ácidos grasos en la fase exponencial de 0.13 para C6:0; de 0.49 para C8:0; 3.61 para C10:0; 0.96 para C:11; 0.13 para C12:0; 1.89 para C13:0; 0.38 para C14:0;
15 0.18 para C:15; 12.47 para C16:0; 0.19 para C17:0; 1.74 para C18:0; 0.21 para C:20; 0.11 para C:24; 0.43 para C14:1; 0.33 para C15:1; 9.25 para C16:1; 6.18 para C17.1; 0.06 para C24:1; 12.09 para C18:1n-9; 0.11 para C20:1n-9; 0.18 para C22:1n-9; 0.19 para C18:2n-6c; 12.04 para C18:2n-6t; 0.19
20 para C18:3n-6; 36.31 para C18:3n-3; 0.00 para C20:2; 0.08 para C20:3n-3; 0.06 para C20:5n-5. El perfil de lípidos durante la fase estacionaria corresponde a 0.15 para C6:0; de 0.36 para C8:0; 3.02 para C10:0; 1.06 para C:11; 0.00 para C12:0; 1.56 para C13:0; 0.38 para C14:0; 0.19 para C:15;
25 19.71 para C16:0; 0.23 para C17:0; 2.09 para C18:0; 0.30 para C:20; 0.07 para C:24; 0.33 para C14:1; 0.08 para C15:1; 8.13 para C16:1; 1.56 para C17.1; 0.09 para C24:1; 23.23 para C18:1n-9; 0.30 para C20:1n-9; 0.38 para C22:1n-9; 0.09 para C18:2n-6c; 10.42 para C18:2n-6t; 0.10 para C18:3n-6;
30 25.89 para C18:3n-3; 0.08 para C20:2; 0.12 para C20:3n-3; 0.08 para C20:5n-5.

6.- El uso de las células de *Chlorella vulgaris* Beyerinck

obtenidas del paso 4, para la producción de biocombustibles.

7.- El uso de las células de *Chlorella vulgaris* Beyerinck obtenidas del paso 4, para preparar un suplemento alimenticio.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/MX2019/050030

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, INSPEC, NPL, INTERNET

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KIM, D.G. et al., "Manipulation of light wavelength at appropriate growth stage to enhance biomass productivity and fatty acid methyl ester yield using <i>Chlorella vulgaris</i> ", <i>Bioresource Technology</i> , 2014, Vol. 159, Pags 240-248, doi: 10.1016/j.biortech.2014.02.078. the whole document.	1-7
A	BLAIR, M. F. et al., "Light and growth medium effect on <i>Chlorella vulgaris</i> biomass production", <i>JOURNAL OF ENVIRONMENTAL CHEMICAL ENGINEERING</i> , 2014, Vol. 2, N°. 1, Pags 665-674, ISSN: 2213-3437, doi.org/10.1016/j.jece.2013.11.005, the whole document.	1-7
A	WONG, Y.K. et al., "Growth medium screening for <i>Chlorella vulgaris</i> growth and lipid production", <i>JOURNAL OF AQUACULTURE & MARINE BIOLOGY</i> , 2017, Vol. 6, N° 1, Pags. 00143. [en línea][retrieved on 14/03/2020]. Retrieved on Internet <URL: https://medcraveonline.com/JAMB/JAMB-06-00143.pdf >. the whole document.	1-7

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20/03/2020

Date of mailing of the international search report
(29/04/2020)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer
J. Vizán Arroyo

Telephone No. 91 3498573

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/MX2019/050030

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GOUR, R.S. et al, "Enhanced microalgal lipid production with media engineering of potassium nitrate as a nitrogen source", BIOENGINEERED , 2018 Jan, Vol. 9, No. 1, Pags. 98-107, ISSN: 2165-5979(print), ISSN: 2165-5987 (electronic), the whole document.	1-7
A	KHALILI, A. et al., "Influence of nutrients and LED light intensities on biomass production of microalgae <i>Chlorella vulgaris</i> ", BIOTECHNOLOGY AND BIOPROCESS ENGINEERING , APR 2015, Vol. 20, No. 2, Pags 284-290, ISSN: 1226-8372(print), ISSN: 1976-3816(electronic), doi:10.1007/s12257-013-0845-8, the whole document.	1-7
A	HULTBERG, M. et al., "Impact of light quality on biomass production and fatty acid content in the microalga <i>Chlorella vulgaris</i> ", BIORESOURCE TECHNOLOGY , 2014 May, Vol.159, Pags. 465-467., ISSN: 0960-8524(print), ISSN:1873-2976 (electronic), doi: 10.1016/j.biortech.2014.03.092., the whole document.	1-7

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N1/12 (2006.01)

C12N13/00 (2006.01)

C12P7/64 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/MX2019/050030

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C12N, C12P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, INSPEC, NPL, INTERNET

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	KIM, D.G. et al., "Manipulation of light wavelength at appropriate growth stage to enhance biomass productivity and fatty acid methyl ester yield using <i>Chlorella vulgaris</i> ", <i>Bioresource Technology</i> , 2014, Vol. 159, Págs 240-248, doi: 10.1016/j.biortech.2014.02.078. todo el documento.	1-7
A	BLAIR, M. F. et al., "Light and growth medium effect on <i>Chlorella vulgaris</i> biomass production", <i>JOURNAL OF ENVIRONMENTAL CHEMICAL ENGINEERING</i> , 2014, Vol. 2, No. 1, Págs 665-674, ISSN: 2213-3437, doi.org/10.1016/j.jece.2013.11.005 todo el documento.	1-7
A	WONG, Y.K. et al., "Growth medium screening for <i>Chlorella vulgaris</i> growth and lipid production", <i>JOURNAL OF AQUACULTURE & MARINE BIOLOGY</i> , 2017, Vol. 6, No 1, Págs. 00143. [en línea] [recuperado el 14/03/2020]. Recuperado de Internet <URL: https://medcraveonline.com/JAMB/JAMB-06-00143.pdf >. todo el documento.	1-7

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
20/03/2020

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
29 de abril de 2020 (29/04/2020)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
J. Vizán Arroyo
Nº de teléfono 91 3498573

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/MX2019/050030

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	GOUR, R.S. et al, “Enhanced microalgal lipid production with media engineering of potassium nitrate as a nitrogen source”, BIOENGINEERED , 2018 Jan, Vol. 9, No. 1, Págs. 98-107, ISSN: 2165-5979(print), ISSN: 2165-5987(electronic), todo el documento.	1-7
A	KHALILI, A. et al., “Influence of nutrients and LED light intensities on biomass production of microalgae <i>Chlorella vulgaris</i> ”, BIOTECHNOLOGY AND BIOPROCESS ENGINEERING , APR 2015, Vol. 20, No. 2, Págs 284-290, ISSN: 1226-8372(print), ISSN: 1976-3816(electronic), doi:10.1007/s12257-013-0845-8, todo el documento.	1-7
A	HULTBERG, M. et al., “Impact of light quality on biomass production and fatty acid content in the microalga <i>Chlorella vulgaris</i> ”, BIORESOURCE TECHNOLOGY , 2014 May, Vol.159, Págs. 465-467., ISSN: 0960-8524(print), ISSN: 1873-2976 (electronic) doi: 10.1016/j.biortech.2014.03.092., todo el documento.	1-7

CLASIFICACIONES DE INVENCIÓN

C12N1/12 (2006.01)

C12N13/00 (2006.01)

C12P7/64 (2006.01)