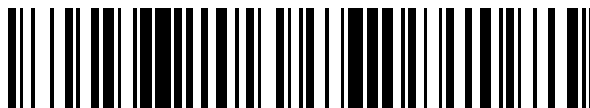


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 673 369**

(21) Número de solicitud: 201731448

(51) Int. Cl.:

C12N 11/02 (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)
C12M 3/00 (2006.01)

(12)

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

(22) Fecha de presentación:

21.12.2017

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

21.06.2018

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

05.04.2019

Fecha de concesión:

10.05.2019

(45) Fecha de publicación de la concesión:

20.05.2019

(73) Titular/es:

MICROALGAE SOLUTIONS S.L. (100.0%)
Calle Galicia, 10. 2ºB
28320 Pinto (Madrid) ES

(72) Inventor/es:

DE LA ROCHE CADAVID, Juan Pablo y
GALÁN GÓMEZ, Pedro Luis

(54) Título: **Método de cultivo y sistema de cultivo de biomasa de consorcios ad-hoc de microalgas y cianobacterias en biofilm con fines industriales.**

(57) Resumen:

Un método y un sistema, para el cultivo de consorcios ad-hoc de especies de microalgas y cianobacterias en biofilm para fines industriales.

El método comprende las etapas de acondicionamiento del sustrato de cultivo, mezcla de cultivos puros, alimentación y mantenimiento del cultivo.

El sistema comprende un Foto-fermentador Abierto de Células Inmovilizadas (FACI) y un mecanismo de bombeo del medio de cultivo. Este FACI opera al menos de dos maneras: controlando el medio de cultivo, el caudal y la conductividad o; controlando además la temperatura y/o la iluminación, el nivel de partículas y/o el CO₂ en la atmósfera que rodea al FACI.

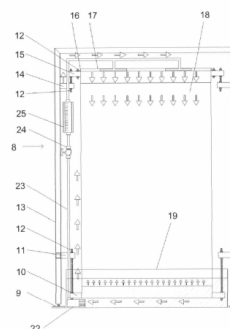


FIGURA 12

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
 Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 673 369 B2

DESCRIPCIÓN

Método de cultivo y sistema de cultivo de biomasa de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm con fines industriales.

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

10 La presente invención pertenece al sector de la industria de las microalgas y cianobacterias y más concretamente a los métodos y a los sistemas de producción de biomasa.

El objeto principal de la presente invención es una metodología y un sistema que permiten cultivar de manera combinada (en consorcio *ad-hoc*) una amplia gama de especies de microalgas y cianobacterias en biofilm, con la que se obtiene una biomasa que contiene
15 diversos Compuestos Bioactivos de Alto Valor (CAVAS) que son de interés para la industria.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Métodos de cultivo de microalgas y cianobacterias

20

Los métodos de cultivo de microalgas y cianobacterias con fines de producción de biomasa se realizan utilizando técnicas de microbiología y procedimientos de escalado industrial para aumentar los volúmenes de producción. El proceso se inicia a partir de una cepa de una especie, procedente de una colección pública o privada, que es cultivada en volúmenes
25 pequeños y posteriormente se escala a mayores volúmenes de cultivo. Durante este proceso, existen diversas metodologías para el control de los principales parámetros fisicoquímicos que intervienen en el cultivo: temperatura, iluminación, suministro de CO₂ y fuente de nutrientes.

Dodd et al (2014), en US 2014/0051131 A1, describen un método para el monocultivo de
30 especies de microalgas o cianobacterias con fines de producción de biomasa, optimizando la producción a partir de estímulos de iluminación controlada. En estas condiciones es posible incrementar la producción de ciertos metabolitos. Entre las especies que se citan están *Chlorella sp*, *Synechococcus sp* y *Trachidiscus sp*.

35 En ocasiones las microalgas son cultivadas en ausencia de luz. En US8557249 B2, Brooks &

Franklin (2013) reivindican un método para la producción de microalgas por medios heterotróficos para la obtención de biomasa con fines cosméticos, proporcionando como ejemplo el cultivo de *Chlorella sp.*

- 5 Ganuza et al (2014), en WO 2014074769 A2, han desarrollado un método para el cultivo no axénico (no puro) de microorganismos en condiciones mixotróficas en el que intervienen las microalgas. Los autores describen, además, un método para el control del crecimiento de bacterias y aumento de la productividad utilizando oxígeno. Esta invención reivindica el uso de una fuente de carbono y suplemento de sales como fuente nutritiva, el uso de tanques de cultivo, control de pH y fotoperíodo y la fuente de iluminación. Pese a las mejoras sobre el control de las condiciones de cultivo, este sistema no contempla el desarrollo de consorcios *ad hoc* de microalgas y cianobacterias.

- De particular interés para la presente invención, Le Bihan et al. (2014), en US20140356931 A1, describen un método y un sistema de tanque fotobiorreactor abierto para la producción de microalgas, basado en el principio de consorcio de al menos dos especies de microalgas. Con este sistema se controla la iluminación y, además, se favorece los procesos de floculación para la cosecha, sin afectar el crecimiento de las microalgas en el medio de cultivo. Este sistema subraya las ventajas de cultivo de consorcios, sin embargo, solamente establecen el cultivo de microalgas y no la asociación con cianobacterias. Además, para controlar la calidad de los cultivos no se describe la manera de establecer los consorcios.

- En la presente invención se describe un método para el cultivo de consorcios *ad-hoc* de al menos una microalga y una cianobacteria en biofilm, que garantiza la trazabilidad, desde el cultivo de las especies en condiciones axénicas en laboratorio hasta el cultivo de consorcios *ad-hoc* en foto-fermentadores.

Sistemas de cultivo de microalgas y cianobacterias

- 30 Los sistemas que se utilizan para el cultivo de microalgas o cianobacterias constan de un contenedor o un sustrato, denominado foto-biorreactor o Foto-fermentador, dentro del cual se dispone de un medio de cultivo al que se incorporan sustancias nutritivas (sales inorgánicas y/o compuestos orgánicos), una fuente de iluminación y una fuente de CO₂.
- 35 Estos sistemas de producción de microalgas y cianobacterias se clasifican en dos grandes

grupos: los sistemas abiertos y los sistemas cerrados.

Los sistemas abiertos son aquellos en donde las microalgas crecen en contacto con el aire y donde existe la posibilidad de contaminación por otros microorganismos. Así mismo, los cultivos están expuestos a los cambios de temperatura, pluviosidad e insolación del medio ambiente circundante. Por lo general, tienen un gran consumo de agua y baja productividad, aunque tienen bajo coste de construcción y mantenimiento.

Los sistemas abiertos más utilizados son tanques rectangulares o circulares de escasa profundidad. Las principales especies que se cultivan con estos sistemas son: *Arthrospira platensis* (espirulina), *Dunaliella salina*, *Hematococcus pluviatilis*. Estas especies suelen crecer en medio líquido en condiciones extremófilas, lo que reduce las probabilidades de contaminación por otros microorganismos.

Una variante de los sistemas abiertos lo constituye los bioreactores de células inmovilizadas. Este tipo de sistemas permiten reducir el uso de agua, son de bajo coste económico y suelen ser fácilmente escalables. Pese a estas ventajas este tipo de sistemas no consideran métodos de control de la producción de las especies en cultivo. Algunos ejemplos son:

Plitt et al. 1996 describen, en US5585266 A, un sistema conformado por un panel de tejido de fibras naturales o artificiales contenido en un marco bastidor cerrado, estanco al aire y al agua.

Fernández (2011), en WO2011/138477 A1, presenta un sistema similar, pero no estanco al aire y al agua con una cámara interior para la difusión de gases. Con este tipo de foto-biorreactores se mejora la productividad respecto a los otros sistemas abiertos, gracias a la aportación de CO₂ desde el interior.

Gross & Wen (2014) en US 20140273171 A1 describe un mecanismo con el que los paneles se hace pasar un medio líquido utilizando un sistema de poleas y un motor para generar el movimiento del tejido. Con este sistema, además, se automatiza la recogida de las microalgas y se indica que es idóneo para el monocultivo de diversas especies de microalgas y cianobacterias, sin embargo, no se presenta como un sistema escalable industrialmente.

Por otra parte, los sistemas cerrados consisten en foto-biorreactores aislados del contacto con el medio externo y en donde se desarrolla el cultivo en condiciones controladas de temperatura, iluminación, salinidad e intercambio de gases. En estos sistemas se incrementa la productividad de las especies que están siendo cultivadas en régimen de monocultivo. Según Enzing et al. (2014. *JRC Scientific and policy reports*). las especies que más se cultivan en estos sistemas son: *Nannochloropsis* sp, *Phaeodactylum* sp, *Nitzschia* sp, *Cryptocodinium* sp, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus almeriensis*, *Coelastrella striolata*.

De manera general, los sistemas cerrados suelen requerir de elevado coste de inversión, presentan un alto gasto energético y están diseñados para la producción de especies en régimen de monocultivo.

5

En la presente invención se describe un sistema de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm. Este es un sistema de cultivo abierto de células inmovilizadas, con la ventaja de presentar bajo coste de operación y escalabilidad. Además, tiene la ventaja de operarse como otros sistemas cerrados, controlando las variables de cultivo (temperatura, intercambio de gases, pH, salinidad, caudal de agua, entre otros). Estas ventajas favorecen el rendimiento de la producción, y el control de la calidad de la biomasa que se produce.

El cultivo de consorcio *ad-hoc* genera asociaciones beneficiosas entre microalgas y cianobacterias para promover unas características bioquímicas particulares en la biomasa del producto final. Los CAVAS que se obtienen proceden de las propias especies y además de la matriz extracelular que se forma, producto de la interacción entre ellas.

La base conceptual del cultivo de consorcios *ad-hoc*, de esta invención, procede del hecho de que es bien conocida la cooperación mutualista entre las microalgas y las bacterias. En esta cooperación ocurre intercambio de nutrientes y dinámicas interacciones a través de señales moleculares que pueden ir en beneficio o detrimento del desarrollo entre especies. Cooper & Smith (2015. Curr. Opin. Plant Biol., 26) y Unnithan et al. (2014. *Algal Research*, 4) dan cuenta en diversos ejemplos de cooperación entre especies de microalgas y cianobacterias. Uno de los principales retos de la industria de las microalgas es aprovechar estas interacciones mutualísticas para beneficiarse de posibles escenarios para mejorar el rendimiento del cultivo y obtener nuevos CAVAS (Cooper & Smith, 2015, *op. cit.*).

Estos fenómenos de interacción entre microorganismos en consorcio se manifiestan como una comunicación a través de señales moleculares y son conocidos como “quorum sensing” (Bassler, 2002. *Cell* (109); Dobretsov et al. 2013. *Biofouling* (25); Montgomery et al. 2013. *Life (Basel)* 3(1)). Este fenómeno es tipificado en la formación de biofilms por la dependencia de la densidad celular y normalmente ocurre cuando se alcanza un número crítico de individuos en cada especie.

En la presente invención se utiliza un método y un sistema para el cultivo de consorcios *ad-hoc* de especies de microalgas y cianobacterias que conforman un biofilm, en el que las especies que intervienen han sido seleccionadas a propósito.

Biomasa de microalgas y cianobacterias en biofilm con fines industriales

5 Las microalgas y cianobacterias están siendo objeto de cultivo en diversos países y son utilizados como ingredientes para alimentación animal, para alimentación humana (suplementos, nutracéuticos, antioxidantes, vitaminas, entre otros) y para la producción de CAVAS como lípidos, proteínas, azúcares, minerales, vitaminas, pigmentos, polímeros y otras moléculas de aplicación en la industria cosmética, farmacéutica, la industria química, la
10 industria de la energía y la industria de los materiales.

Encontramos diversas especies que están siendo producidas para su aprovechamiento industrial. WIPO, OMPIC & MASCIR. (2016. www.wipo.int/edocs) y Priyadarashani & Rath (2012. *J. Algal Biomass Utln* 3 (4)) realizan una síntesis de las principales especies de
15 microalgas y cianobacterias que han sido objeto de patente en la industria en general. Las especies más utilizadas son: *Arthrospira platensis*, *Chlorella sp*, *Nannochloropsis oculata* y *Dunaliella salina*. Existen otras especies que están siendo utilizadas, como son: *Phaedactylum tricornutum*, *Skeletonema costatum*, *Rhodospirillum rubrum* y *Dysmorphococcus globosus* (fuente propia).

20

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

La descripción de la invención está dividida en dos epígrafes. La sección I.; Definiciones; especialmente indicado para los no expertos y la sección II.; Detalles de la invención. En esta
25 sección se describe en el apartado A. Método de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm; en B. Sistema de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm.

I. DEFINICIONES

30 Las definiciones descritas a continuación son ampliamente aceptadas por expertos de la materia. Algunas de ellas se encuentran referenciadas algunas referencias bibliográficas: Richmond (2004. *Blackwell Publish. Oxford*); Enzing et al. (2014. op. cit.).

Axénico: referido a cultivo de microorganismos, como las microalgas o cianobacterias, de una sola especie en ausencia de otras especies contaminantes.

5 *Biofilm*: película o capa de material de origen biológico conformada por moléculas orgánicas de origen microbiano que albergan microorganismos que se desarrollan en común (bacterias, microalgas, hongos, entre otros)

10 *CAVAS*: compuestos activos de alto valor. También se definen como moléculas de carácter estructural o de reserva, constituyentes de las células, en este caso referido a las microalgas o a las cianobacterias. Se pueden considerar CAVAS a moléculas como: las proteínas, lípidos, hidratos de carbono, minerales y además componentes completos; o componentes fraccionados, tales como aminoácidos, péptidos; o conformando compuestos más complejos, tales como pigmentos, vitaminas y otros.

15 *Cianobacteria*: son organismos procariotas; bacterias conocidas como algas azul-verdosas por ser portadoras de pigmentos y tener capacidad fotosintética. Viven de manera individual o de forma colonial.

Consortio ad hoc: hace referencia a una asociación de especies de microorganismos de grupos taxonómicos diferentes (microalgas, cianobacterias, hongos, levaduras, entre otros), que se realiza de manera deliberada, para lograr la proliferación de las especies y generar un rendimiento en biomasa de entre 1,2 y 4 g/m²/día. Estas interacciones dan lugar a un equilibrio dinámico de la comunidad microbiana.

Equilibrio de quórum: concepto acuñado en esta invención para describir la etapa de mayor crecimiento de la biomasa, en donde la densidad celular de cada especie alcanza su estado de equilibrio.

25 *Foto-fermentadores*: son dispositivos, abiertos o cerrados, provistos de iluminación, natural o artificial, utilizados para el cultivo de microalgas y cianobacterias. También son conocidos como foto-biorreactores.

Heterotrófico: referido a cultivo de microorganismos, como las microalgas o cianobacterias, en donde se proporcionan una fuente de carbono como fuente de alimentación.

Metabolito (molécula bioactiva): Véase CAVAS.

Microalgas: son organismos eucariotas portadores de pigmentos y con capacidad fotosintética. Viven de manera individual o de forma colonial.

5 *Mixotrófico*: referido a cultivo de microorganismos, como las microalgas o cianobacterias, en donde se proporcionan condiciones adecuadas para que los microorganismos consuman alimento directamente del exterior (heterotrofía) o la produzcan ellos mismos (autotrofía).

Monocultivo: cultivo de una sola especie. En el caso de esta invención se trata de cultivos de una sola especie de microalga o cultivos de una sola especie de cianobacteria.

Quorum sensing: es un tipo de comunicación celular entre microorganismos que regula la expresión génica y la densidad celular interespecífica de cada población.

10 *Sala blanca*: o sala limpia es un espacio cerrado diseñado para obtener bajos niveles de contaminación, a través del control de la calidad del aire, la temperatura, la humedad y las partículas en suspensión.

II. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

15

A Método de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm.

Este método de cultivo de consorcio *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm conlleva varias etapas (figura 1) a través de las cuales se cultivan las especies de manera individual y posteriormente en consorcio. Estas etapas incluyen: A1. Hidratación del sustrato fibroso polimérico (1); A2. La mezcla de las cepas puras (2); A3. La alimentación de los cultivos en FACL (3); A4. La limpieza del sistema de producción en FACL (4) .

20

Las principales ventajas del método de esta invención son las siguientes:

✓ El método de cultivo de consorcios *ad-hoc* permite integrar cultivos puros de especies de microalgas y cianobacterias, siendo, hasta el momento el único método que es utilizado para este fin.

25

✓ El método descrito permite realizar distintas combinaciones *ad-hoc* de especies de microalgas y cianobacterias, a partir de cultivos puros, mejorando el control de la

aparición de otras especies, como ocurre con métodos de cultivos abiertos tradicionales de microalgas y cianobacterias.

- ✓ El método mejora la trazabilidad del proceso productivo, respecto a los cultivos abiertos y cerrados tradicionales, porque el medio de cultivo se puede fabricar, controlando las sales básicas y nutritivas que utilizan las microalgas para crecer.
- ✓ El método permite obtener una biomasa de consorcio de especies, con una composición bioquímica más compleja porque está compuesta de los metabolitos de cada especie, de microalgas y cianobacterias, y por los metabolitos producidos por la interacción entre las especies en el medio de cultivo.

A continuación, se describe cada una de las etapas del método de cultivo de consorcios *ad-hoc*:

A1. Hidratación del sustrato fibroso polimérico (1):

En esta etapa se incorpora el medio de cultivo, compuesto de al menos 30 lt de un medio nutritivo, para que el panel absorba el agua y tenga lugar la adhesión de sales minerales en el sustrato (18). Esta etapa debe realizarse en un período de 24 a 48 horas.

A2. Mezcla de cultivos puros (2):

En esta etapa se realiza la mezcla de cultivos de cultivos puros de las microalgas y cianobacterias en el depósito del FACI que contiene al menos 30 litros del medio de cultivo. El primer paso es incorporan entre 3 y 6 litros de cultivo de al menos una especie de cianobacteria. Pasados 48 horas, una vez las cianobacterias haya colonizado el sustrato fibroso (5) (figura 2), se incorporan entre 3 y 6 litros de al menos una especie de microalga. En este punto las cianobacterias forman un entramado de fibras que favorecen la fijación pasiva de conglomerados de microalgas, para dar lugar a la estructura final del consorcio de microalgas y cianobacterias en biofilm (6).

A3. Alimentación de los cultivos en FACI (3):

Para garantizar el desarrollo del consorcio es necesario incorporar los medios nutritivos 2 veces por semana.

5

A4. Mantenimiento de los cultivos en FACI (3):

Para garantizar la estabilidad del consorcio es necesario realizar la limpieza del FACI 1 vez por semana. La limpieza consiste en eliminar parcialmente el medio de cultivo, lavar las paredes y el fondo de la cuba donde se acumula el medio de cultivo y limpiar las tuberías y la bomba.

10

A partir de los 35 días se considera establecido el consorcio, cuando las especies alcanzan “un equilibrio de quórum”. Este estado se define como el momento a partir del cual la biomasa obtenida regularmente se mantiene sin variaciones, en cuanto a composición de especies (7) (figura 4) y en cuanto a productividad. La productividad media de este tipo de consorcios se establece entre 1,48 y 4 gr de materia seca / m² de sustrato / día, según las especies que intervengan en el consorcio.

15

En otra forma de realización preferente se puede modificar el medio de cultivo si se pretende obtener determinados CAVAS en la biomasa en consorcio final. Por ejemplo, para incrementar el contenido en proteínas se aumenta en proporción el contenido en solución de nitratos en relación 4:1 respecto al resto de los medios nutritivos. En el caso de incrementar el contenido en lípidos totales se incorpora cualquier fuente de carbono orgánico (por ejemplo: glucosa o glicerol) en relación 1:1 con la solución de nitratos.

20

En otra forma de realización preferente se puede modificar la iluminación, cuando se pretende realizar el cultivo en FACI en atmósfera controlada (sala blanca). Se incorpora iluminación LED combinando longitud de onda roja (660 nm) y azul (420 a 470 nm), con el fin de cumplir con los requerimientos de las microalgas y cianobacterias, cuyas necesidades de longitud de onda son diferentes debido a su composición en pigmentos fotosintéticos.

25

En otra forma de realización preferente se puede modificar la iluminación, cuando se pretende realizar el cultivo en FACI en atmósfera controlada (sala blanca). El cultivo se puede realizar en ausencia de luz y añadiendo una fuente de carbono orgánico como suplemento alimenticio. De

30

este modo la biomasa de consorcio modifica su forma de producción a heterotrófica, siendo especialmente indicada para la producción de lípidos de alto valor.

En otra forma de realización preferente se puede modificar la atmósfera para incorporar CO₂ con el fin de aumentar la productividad en un 30%. En esta realización el CO₂ será transferido a la atmósfera circundante a una concentración del 5%.

B. Sistema de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm:

El sistema que se describe a continuación hace referencia a un Foto-fermentador de Células Inmovilizadas (8) que opera en condiciones abiertas al ambiente o en atmósfera controlada (sala blanca).

Las principales ventajas del sistema de cultivo descrito en esta invención son las siguientes:

- ✓ El Foto-fermentador Abierto de Células Inmovilizadas (FACI) es un sistema abierto que permite cultivar consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm, siendo hasta el momento el único sistema que es utilizado para este fin.
- ✓ El artefacto descrito simplifica la estructura de otros fotobiorreactores de células inmovilizadas, mejorando la eficiencia en las labores de siembra, cosechado y limpieza en cada ciclo de cultivo.
- ✓ EL FACI incorpora un modo de distribución de agua denominado “canal desbordante” que garantiza la uniformidad de la lámina de agua sobre el Fotofermentador.
- ✓ El FACI incorpora unos sensores que permite ajustar la tensión superficial de la lámina de sustrato fibroso polimérico, así como sumergirla parcialmente en el medio de cultivo. Esto favorece el flujo ascendente de las sales nutritivas y el crecimiento de las cianobacterias.
- ✓ EL FACI dispone de una válvula de ajuste de caudal y un caudalímetro, que permiten modificar el caudal de medio que discurre entre el sustrato y la cuba de siembra. El caudal es una variable crítica para el tipo de cultivo de consorcio *ad-hoc* que se desea obtener.

El artefacto que se describe en la invención (FACI) está especialmente indicado para el cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm.

5 Está compuesto por un chasis apoyado en cuatro pies de soporte y nivelado. El chasis soporta cuatro conjuntos tensores por medio de alas soporte que permiten ajustar la tensión a la que
10 está sometida una lámina vertical de sustrato fibroso polimérico por medio del conjunto de varilla roscada, tuercas y arandelas. La tensión superficial del sustrato es una variable que influye en el tipo de consorcio que se desea cultivar. A diferencia de la patente WO2011/138477 no dispone de marco bastidor para cámara de gases ya que no se realiza aporte de gases. Otra diferencia es la disposición semi-sumergida de la lámina de geotextil,
15 para favorecer el flujo ascendente, lo que mejora el crecimiento del consorcio, especialmente de las cianobacterias. Adicionalmente, en la presente invención, no existe lámina de malla interna de 5mm de ojo de malla (por ambas caras), se trata de una única lámina de sustrato fibroso polimérico.

20 El sustrato fibroso polimérico se encuentra parcialmente sumergido, en su zona inferior, en una cuba de siembra. Esto permite, por medio de la capilaridad, la penetración de las sales nutritivas del medio de cultivo. Esta característica también favorece el cultivo del consorcio, especialmente, el crecimiento de las cianobacterias.

25 Adicionalmente, se realiza un vertido de medio de cultivo desde la cuba de siembra por la parte superior del sustrato. Para ello, se utiliza una bomba sumergida y una tubería que elevan el medio de cultivo hasta un canal desbordante. En dicha tubería, entre la bomba y el canal desbordante, se disponen una válvula de corte y un caudalímetro. Mediante estos elementos se puede variar el caudal elevado hasta el canal desbordante. El caudal bombeado es determinante en el proceso de cultivo, favoreciendo la aparición de un tipo de consorcio u otro.

30 El canal desbordante garantiza (gracias al nivelado del chasis) un reparto totalmente homogéneo del medio de cultivo sobre el sustrato fibroso polimérico ya que produce un efecto de lámina desbordante sin salpicaduras. El medio de cultivo se recircula constantemente desde la cuba de siembra hasta el canal desbordante y de ahí cae por sustrato fibroso polimérico de nuevo a la cuba de siembra.

35 La forma de realización preferente (figuras 5 a 12) del sistema FACI consiste en un chasis construido (13) mediante un tubo cuadrado de acero inoxidable de 40x40 milímetros y 2 milímetros de espesor. Dicho chasis se apoya en 4 pies de soporte y nivelado (9) que consisten en una chapa circular de acero inoxidable de 100 milímetros de diámetro y 10 milímetros de

espesor. A cada uno de dichos pies se suelda una varilla roscada de acero inoxidable de métrica 10 en el centro del disco (9). En cada varilla se inserta una tuerca y su correspondiente arandela también de acero inoxidable (9). En cada uno de los 4 tubos cuadrados de acero inoxidable (en su parte inferior) se sueldan 4 tapas en cuyo centro se realiza un taladro de 11 milímetros que permite el paso de la varilla roscada. Mediante sistema de tuerca y arandela dicha varilla habilita la variación de la altura de cada pata lo que permite nivelar perfectamente el FACI.

A fin de ajustar perfectamente la tensión superficial del sustrato fibroso polimérico (18) se disponen 4 conjuntos tensores. Tanto las alas soporte tensoras (11 y 14) como los tensores (10 y 15) consisten en un tubo cuadrado de acero inoxidable de 40x40 milímetros y 2 milímetros de espesor. Dichas alas se sueldan al chasis. Se realizan taladros de 11 milímetros tanto en las alas como los tensores. Estos taladros permiten el paso de las varillas roscadas que, junto con las tuercas y arandelas (12), proporcionan un ajuste milimétrico del conjunto.

Los conjuntos de varilla roscada, tuercas y arandelas (12) son idénticos a los utilizados en los pies de apoyo.

En esta forma de realización preferente, el sustrato fibroso polimérico (18) consiste en fibras de polipropileno. Dicho sustrato polimérico se pliega sobre sí mismo en sus dos extremos y posteriormente se cose longitudinalmente. De este modo se genera un túnel que sirve para colgar el sustrato fibroso por medio de los tensores superior (15) e inferior (10). El sustrato fibroso polimérico se encuentra parcialmente sumergido, en su zona inferior, en el medio de cultivo contenido en una cuba de acero inoxidable

Así mismo, sobre el tensor superior se monta el canal desbordante (17) consistente en un perfil en U de acero inoxidable de 40 milímetros de ancho y 20 de alto por 3 milímetros de espesor. En los extremos de este canal se sueldan dos pletinas en ángulo de 90° para cerrar el mismo. En cada una de estas pletinas (en su cara no soldada al canal desbordante) se realiza un taladro de 11 milímetros. Nuevamente, a través de dichos taladros mediante varilla roscada, tuercas y arandelas se fija el canal desbordante al tensor superior.

En esta forma de realización preferente, el medio de cultivo es contenido en una cuba de acero inoxidable (19) con una capacidad total de entre 10 y 150 litros. El acero inoxidable tiene un acabado superficial 2B. Para mejorar la limpieza de la cuba, una forma de realización aún más preferente es la utilización de un acero inoxidable con acabado 2R o BA.

Gracias a la bomba sumergida (22) el medio de cultivo es bombeado a través de la tubería de PVC de 16 milímetros (23) hasta inundar de manera homogénea el canal desbordante gracias a las 4 salidas dispuestas en el mismo.

Como se ha mencionado, el control del caudal de medio de cultivo es de suma importancia.

- 5 Para garantizar dicha regulación, se dispone una válvula de ajuste de caudal de PVC (24) y un caudalímetro (15).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 10 Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

- 15 Figura 1. Método de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm, según la realización preferente. Descripción de cada etapa del método.

- Figura 2. Método de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm, según la realización preferente. Detalle de la etapa de cultivo en FACI: asentamiento de sales nutritivas y formación del biofilm de microalgas y cianobacterias (400x). Fibra artificial del sustrato fijo (S) y Matriz de mucopolisacárido con asentamiento bacteriano (M).

- Figura 3. Biomasa de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias marinas verdes en biofilm. Está compuesta por: **O.** *Oscillatoria* sp (cianobacteria), **N.** *Nannochloropsis gaditana*, **T.** *Tetraselmis chuii*.

- 25 Figura 4. Biomasa de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias marinas verdes en biofilm. Detalle de la composición relativa de las especies del consorcio . La flecha indica el punto de "equilibrio de quórum".

- Figura 5. Sistema de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm, según la realización preferente.

- 30 Figura 6 Sistema de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm, según la realización preferente. Vista frontal A: vista frontal del Fotobiorreactor Abierto de Células Inmovilizadas (FACI) sin la cuba para medio de cultivo.

- Figura 7 Sistema de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm, según la realización preferente. Sección A: sección del FACI sin la cuba para medio de

cultivo.

Figura 8 Sistema de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm, según la realización preferente. Alzado: vista lateral del FACL con la cuba para medio de cultivo.

5 Figura 9 Sistema de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm, según la realización preferente. Vista frontal B: vista frontal del FACL con la cuba para medio de cultivo.

Figura 10 Sistema de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm, según la realización preferente. Sección B: sección transversal del FACL con la cuba
10 para medio de cultivo.

Figura 11 Sistema de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm, según la realización preferente. Sección C: sección longitudinal del FACL con la cuba para medio de cultivo.

Figura 12 Sistema de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm,
15 según la realización preferente. Hidráulica: sección transversal del FACL con la cuba para medio de cultivo, bomba sumergida, tuberías, válvula de ajuste de caudal y caudalímetro.

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

20

A Método de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm

El modo de realización preferente de cada una de las etapas del método de cultivo de consorcio *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias (figura 1), se describe a continuación:

25

A1. Hidratación del sustrato fibroso polimérico (1):

En esta etapa se incorpora el medio de cultivo, compuesto de al menos 30 lt de un medio nutritivo, para que el panel absorba el agua y tenga lugar la adhesión de sales minerales en el sustrato (18). Esta etapa debe realizarse en un período de 24 a 48 horas.

30

A2. Mezcla de cultivos puros (2):

En esta etapa se realiza la mezcla de cultivos de cultivos puros de las microalgas y

cianobacterias en el depósito del FACL que contiene al menos 30 litros del medio de cultivo. El primer paso es incorporar entre 3 y 6 litros de cultivo de al menos una especie de cianobacteria. Pasados 48 horas, una vez las cianobacterias haya colonizado el sustrato fibroso (5) (figura 2), se incorporan entre 3 y 6 litros de al menos una especie de microalga. En este punto las cianobacterias forman un entramado de fibras que favorecen la fijación pasiva de conglomerados de microalgas, para dar lugar a la estructura final del consorcio de microalgas y cianobacterias en biofilm (6).

10 A3. Alimentación de los cultivos en FACL (3):

Para garantizar el desarrollo del consorcio es necesario incorporar los medios nutritivos 2 veces por semana.

15 A4. Mantenimiento de los cultivos en FACL (3):

Para garantizar la estabilidad del consorcio es necesario realizar la limpieza del FACL 1 vez por semana. La limpieza consiste en eliminar parcialmente el medio de cultivo, lavar las paredes y el fondo de la cuba donde se acumula el medio de cultivo y limpiar las tuberías y la bomba.

A partir de los 35 días se considera establecido el consorcio, cuando las especies alcanzan “un equilibrio de quórum”. Este estado se define como el momento a partir del cual la biomasa obtenida regularmente se mantiene sin variaciones, en cuanto a composición de especies (7) (figura 3 y 4) y en cuanto a productividad. La productividad media de este tipo de consorcios se establece entre 1,48 y 4 gr de materia seca / m² de sustrato / día, según las especies que intervengan en el consorcio.

En otra forma de realización preferente se puede modificar el medio de cultivo si se pretende obtener determinados CAVAS en la biomasa en consorcio final. Por ejemplo, para incrementar el contenido en proteínas se aumenta en proporción el contenido en solución de nitratos en relación 4:1 respecto al resto de los medios nutritivos. En el caso de incrementar el contenido en lípidos totales se incorpora cualquier fuente de carbono orgánico (por ejemplo: glucosa o glicerol) en relación 1:1 con la solución de nitratos.

En otra forma de realización preferente se puede modificar la iluminación, cuando se pretende realizar el cultivo en FACI en atmósfera controlada (sala blanca). Se incorpora iluminación LED combinando longitud de onda roja (660 nm) y azul (420 a 470 nm), con el fin de cumplir con los requerimientos de las microalgas y cianobacterias, cuyas necesidades de longitud de onda son diferentes debido a su composición en pigmentos fotosintéticos.

En otra forma de realización preferente se puede modificar la iluminación, cuando se pretende realizar el cultivo en FACI en atmósfera controlada (sala blanca). El cultivo se puede realizar en ausencia de luz y añadiendo una fuente de carbono orgánico como suplemento alimenticio. De este modo la biomasa de consorcio modifica su forma de producción a heterotrófica, siendo especialmente indicada para la producción de lípidos de alto valor.

En otra forma de realización preferente se puede modificar la atmósfera para incorporar CO₂ con el fin de aumentar la productividad en un 30%. En esta realización el CO₂ será transferido a la atmósfera circundante a una concentración del 5%.

B. Sistema de cultivo de consorcio *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias:

La forma de realización preferente (figuras 5 a 12) del sistema FACI consiste en un chasis construido (13) mediante un tubo cuadrado de acero inoxidable de 40x40 milímetros y 2 milímetros de espesor. Dicho chasis se apoya en 4 pies de soporte y nivelado (9) que consisten en una chapa circular de acero inoxidable de 100 milímetros de diámetro y 10 milímetros de espesor. A cada uno de dichos pies se suelda una varilla roscada de acero inoxidable de métrica 10 en el centro del disco (9). En cada varilla se inserta una tuerca y su correspondiente arandela también de acero inoxidable (9). En cada uno de los 4 tubos cuadrados de acero inoxidable (en su parte inferior) se sueldan 4 tapas en cuyo centro se realiza un taladro de 11 milímetros que permite el paso de la varilla roscada. Mediante sistema de tuerca y arandela dicha varilla habilita la variación de la altura de cada pata lo que permite nivelar perfectamente el FACI.

A fin de ajustar perfectamente la tensión superficial del sustrato fibroso polimérico (18) se disponen 4 conjuntos tensores. Tanto las alas soporte tensoras (11 y 14) como los tensores (10

y 15) consisten en un tubo cuadrado de acero inoxidable de 40x40 milímetros y 2 milímetros de espesor. Dichas alas se sueldan al chasis. Se realizan taladros de 11 milímetros tanto en las alas como los tensores. Estos taladros permiten el paso de las varillas roscadas que, junto con las tuercas y arandelas (12), proporcionan un ajuste milimétrico del conjunto.

- 5 Los conjuntos de varilla roscada, tuercas y arandelas (12) son idénticos a los utilizados en los pies de apoyo.

En esta forma de realización preferente, el sustrato fibroso polimérico (18) consiste en fibras de polipropileno. Dicho sustrato polimérico se pliega sobre sí mismo en sus dos extremos y posteriormente se cose longitudinalmente. De este modo se genera un túnel que sirve para
10 colgar el sustrato fibroso por medio de los tensores superior (15) e inferior (10). El sustrato fibroso polimérico se encuentra parcialmente sumergido, en su zona inferior, en el medio de cultivo contenido en una cuba de acero inoxidable

Así mismo, sobre el tensor superior se monta el canal desbordante (17) consistente en un perfil en U de acero inoxidable de 40 milímetros de ancho y 20 de alto por 3 milímetros de espesor.
15 En los extremos de este canal se sueldan dos pletinas en ángulo de 90° para cerrar el mismo. En cada una de estas pletinas (en su cara no soldada al canal desbordante) se realiza un taladro de 11 milímetros. Nuevamente, a través de dichos taladros mediante varilla roscada, tuercas y arandelas se fija el canal desbordante al tensor superior.

En esta forma de realización preferente, el medio de cultivo es contenido en una cuba de acero
20 inoxidable (19) con una capacidad total de entre 10 y 150 litros. El acero inoxidable tiene un acabado superficial 2B. Para mejorar la limpieza de la cuba, una forma de realización aún más preferente es la utilización de un acero inoxidable con acabado 2R o BA.

Gracias a la bomba sumergida (22) el medio de cultivo es bombeado a través de la tubería de PVC de 16 milímetros (23) hasta inundar de manera homogénea el canal desbordante gracias
25 a las 4 salidas dispuestas en el mismo.

Como se ha mencionado, el control del caudal de medio de cultivo es de suma importancia. Para garantizar dicha regulación, se dispone una válvula de ajuste de caudal de PVC (24) y un caudalímetro (15).

REIVINDICACIONES

1. Un método o procedimiento para el cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm en Foto-fermentadores Abiertos de Células Inmovilizadas (FACI) (8) consisten en 4 etapas:
 - a. La etapa de acondicionamiento del sustrato de cultivo, que consiste en incorporar un volumen de entre 30 y 200 lts de medio nutritivo en el depósito para que el panel, conformado por el sustrato fibroso polimérico se hidrate, durante al menos 48 horas (1).
 - b. la etapa de mezcla de cultivos puros que consiste en incorporar al menos 3 litros de cultivo de una especie de cianobacteria y, transcurridas al menos 48 horas, incorporar al menos 3 litros de cultivo de una especie de microalga, ambos, en la cuba para medio de cultivo del FACI (2).
 - c. La alimentación de cultivos en FACI que consiste en incorporar las sales nutritivas al menos 2 veces por semana (3)
 - d. El mantenimiento de cultivos en FACI que consiste en la limpieza del cultivo al menos 1 vez por semana (4).
2. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque la biomasa de consorcio *ad-hoc* que se cultiva consiste en la siguiente combinación de microalgas y cianobacterias:
 - a. Las microalgas marinas verdes *Nannochloropsis gaditana* y *Tetraselmis chuii* y la cianobacteria *Oscillatoria sp* (6).
3. Un método, según las reivindicaciones 1 en donde, transcurridos al menos 30 días, la tasa de productividad de biomasa de consorcio de microalgas y cianobacterias consiste en una ratio entre 1,48 y 4 gr de materia seca/m²/día, según las especies que intervengan en el consorcio.
4. Un método, según la reivindicación 1, que comprende un aumento de la proporción en el contenido de las sales nutritivas de nitratos en relación 4:1 respecto al resto de sales nutritivas para promover un incremento en el contenido en proteínas de la biomasa de consorcios.
5. Un método, según la reivindicación 1, que comprende el suministro de cualquier fuente de carbono orgánico (por ejemplo: glucosa o glicerol) en relación 1:1 con la solución de nitratos, y la ausencia de luz, para promover un incremento en el contenido en lípidos totales y lípidos de alto valor de la biomasa de consorcios.
6. Un método, según la reivindicación 1, que comprende el uso de iluminación artificial LED, combinando longitud de onda roja (660 nm) y azul (420 a 470 nm) en atmósfera

controlada, para promover un incremento en la productividad de la biomasa de consorcios, en al menos un 15%.

7. Un método, según la reivindicación 1, que comprende el uso de una fuente artificial de CO₂, en una concentración del 5% en atmósfera controlada para promover un incremento la productividad del consorcio de microalgas y cianobacterias, al menos un 20%.

8. Un sistema de cultivo de consorcios *ad-hoc* de microalgas y cianobacterias en biofilm (8), tipo Foto-fermentador Abierto de Células Inmovilizadas (FACI) y un mecanismo de bombeo del medio de cultivo que consiste en los siguientes elementos:

a. Un chasis de soporte (13) al que se sueldan las alas soporte para tensor inferior y superior (11 y 12) sobre las que se montan los tensores: inferior (10) y superior (15),

b. un sustrato fibroso polimérico (18) soportado por los tensores inferior (10) y superior (15), por el que fluye en sentido descendente un medio líquido de cultivo que contiene un consorcio de microalgas y cianobacterias bombeado desde una cuba para medio de cultivo (19) a la que vuelve a caer dicho medio de cultivo y en la que el sustrato fibroso polimérico (18) se encuentra parcialmente sumergido,

c. cuatro pies de soporte y nivelado (9), uno en cada una de las 4 extremidades del chasis de soporte (13).

d. un canal desbordante (17) de medio de cultivo en su parte superior, que permite un reparto homogéneo de dicho medio de cultivo, por el principio de lámina desbordante al sustrato fibroso polimérico (18).

e. un tensor inferior (10) y otro superior (15) para ajustar la altura y tensión del sustrato fibroso polimérico (18). Estos tensores (10 y 15) permiten mediante sus correspondientes varillas roscadas, tuercas y arandelas un ajuste perfecto de la tensión a la que se somete el sustrato fibroso polimérico (18). Así mismo, permiten sumergir parcialmente hasta una altura variable el sustrato fibroso polimérico (18) en el medio de cultivo (20) contenido en la cuba para medio de cultivo (19).

f. una bomba sumergida (22) encargada de trasegar el medio de cultivo desde la cuba para medio de cultivo (19) al canal desbordante (17) mediante una tubería (23) en la que hay intercalados un caudalímetro (25) y una válvula de ajuste de caudal (24),

- g. una válvula de ajuste de caudal (24) y un caudalímetro (25) para la regulación del caudal de medio de cultivo que fluye desde la cuba para medio de cultivo (19) hasta el canal desbordante (17).
 - 9. Un sistema de cultivo, según la reivindicación 7, caracterizado porque están integradas al menos dos unidades de sistema de cultivo.
- 5

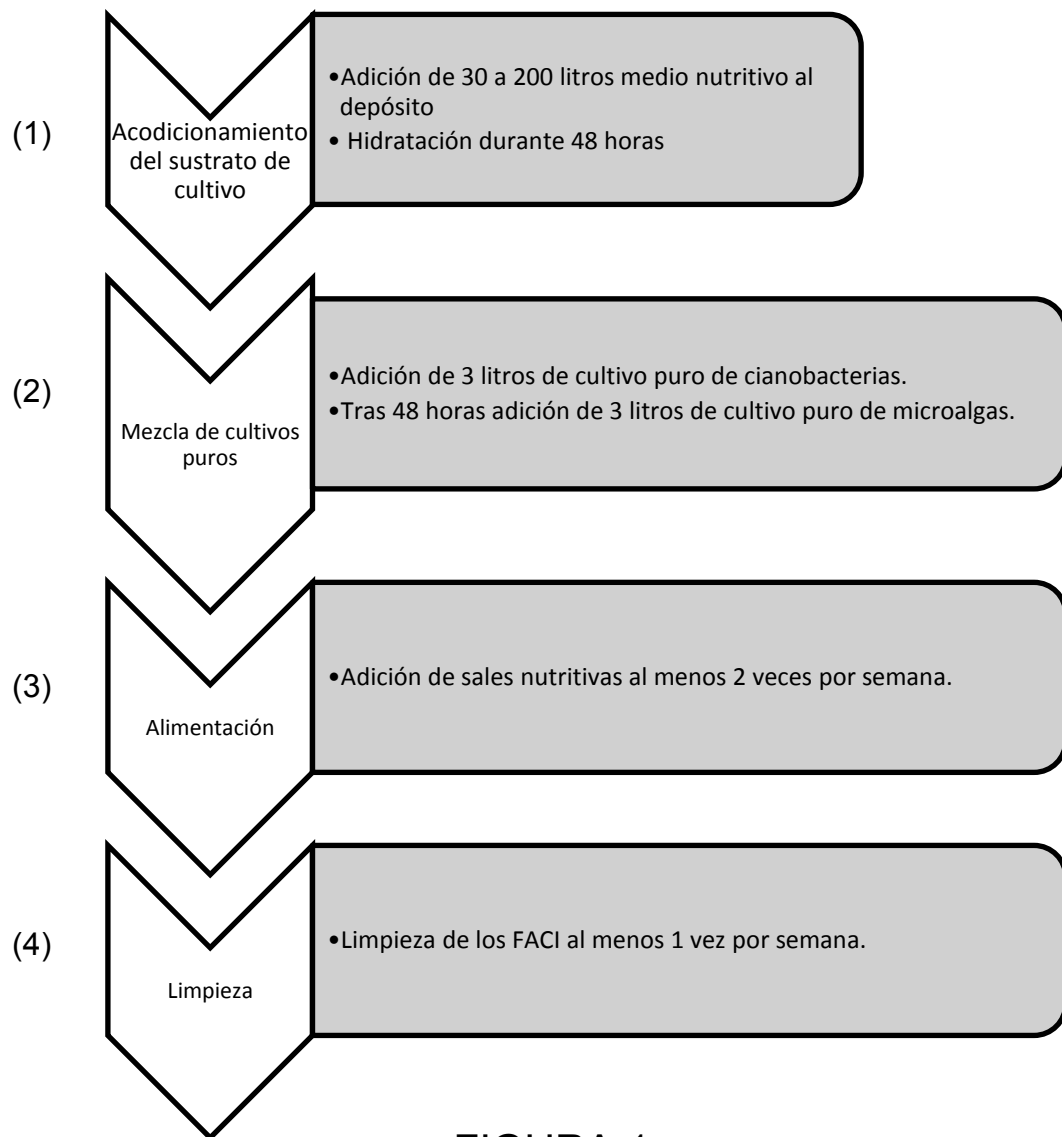


FIGURA 1

(5)

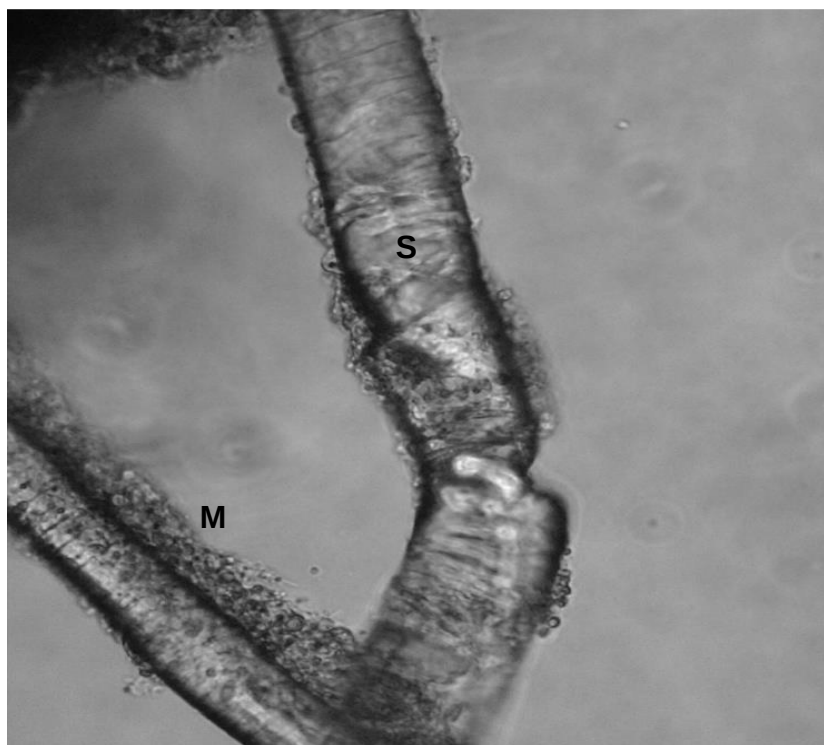


FIGURA 2

(6)

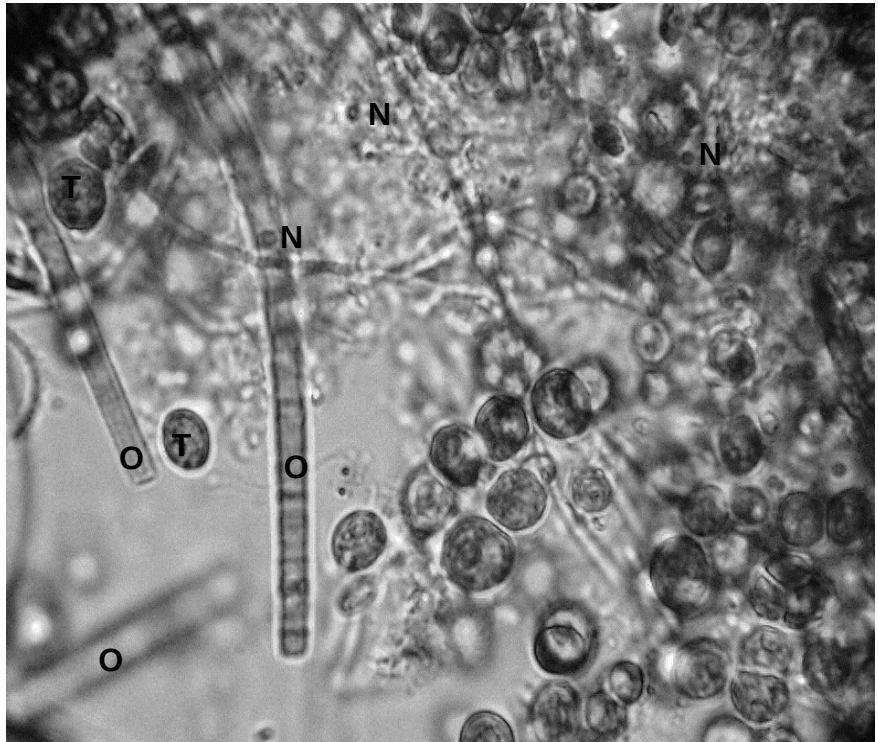


FIGURA 3

(7)

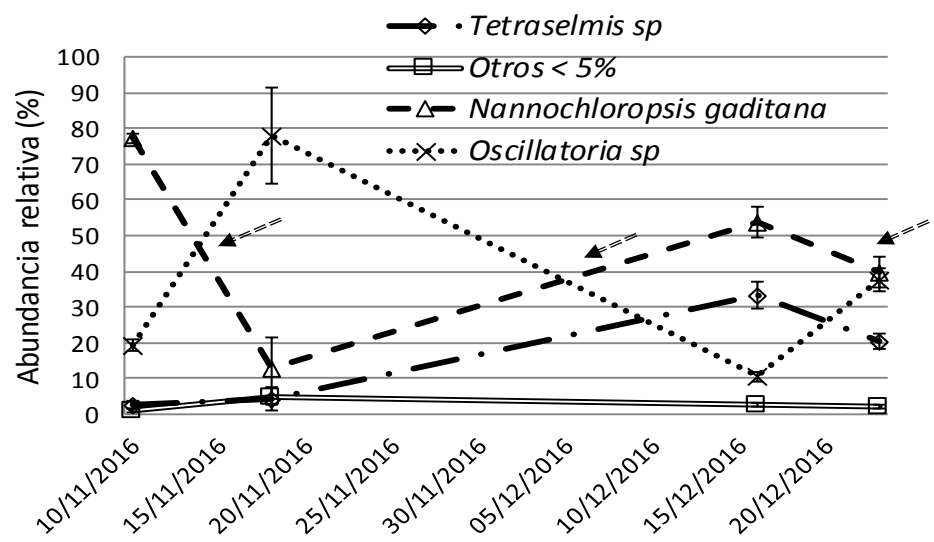


FIGURA 4

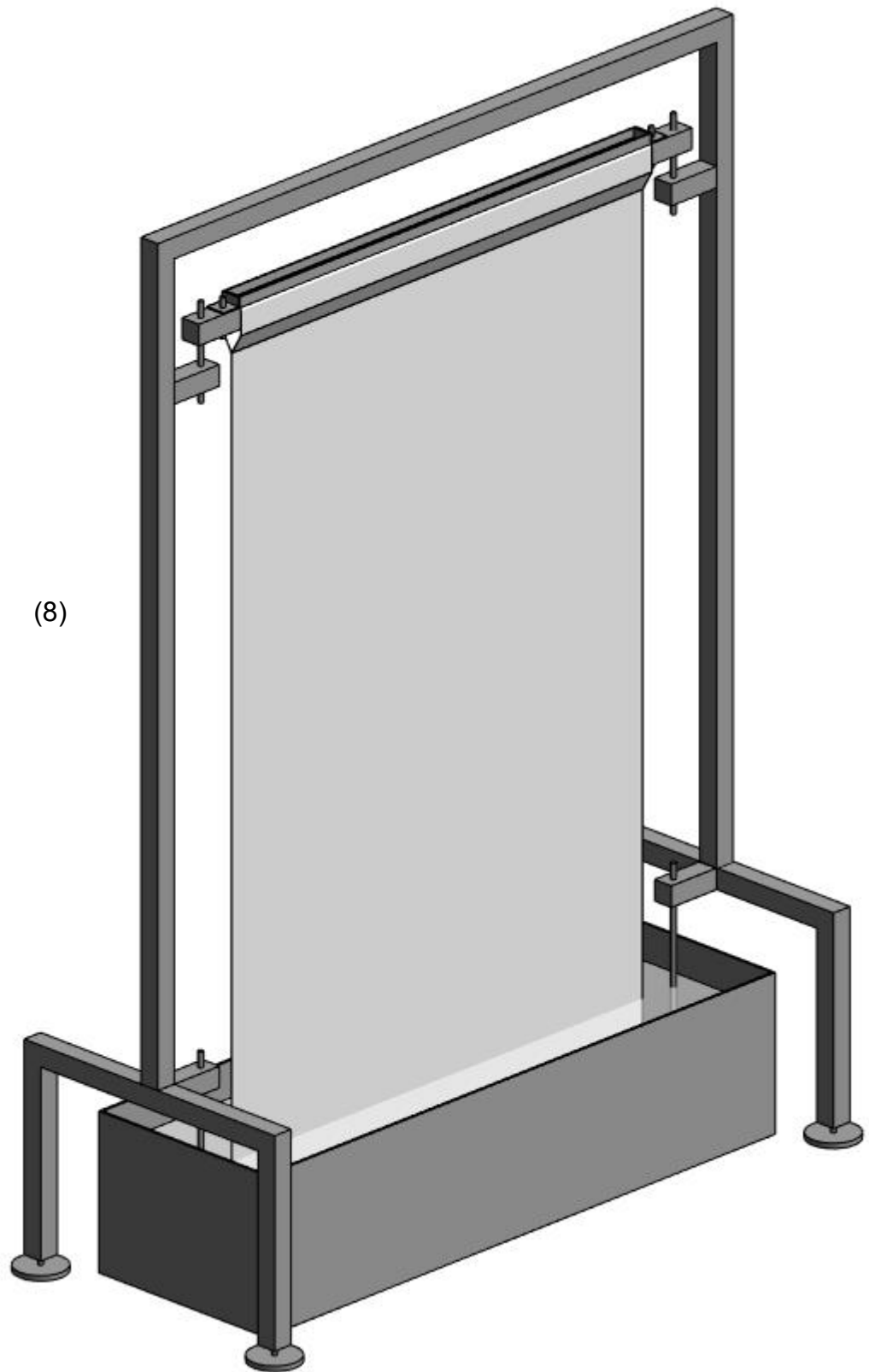


FIGURA 5

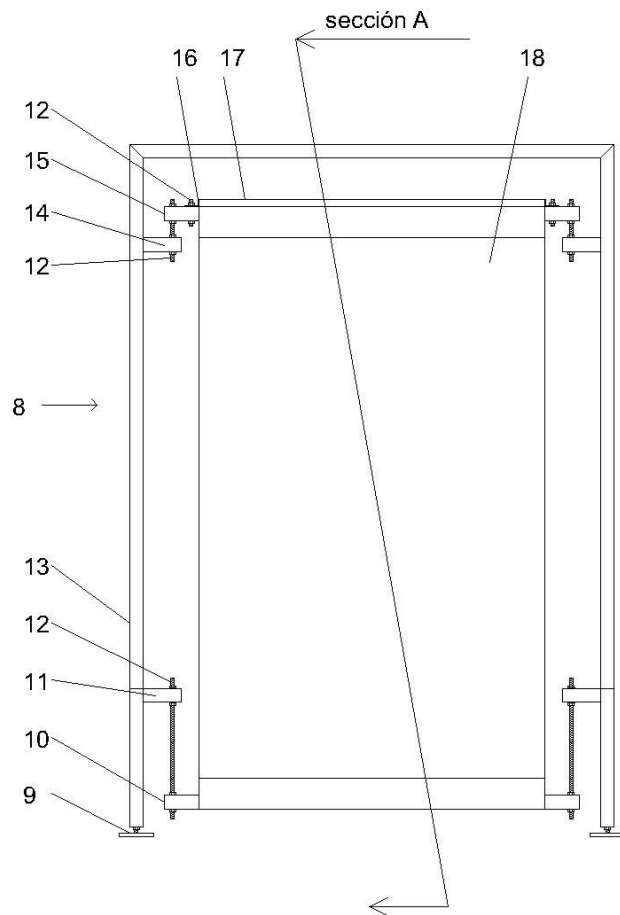


FIGURA 6

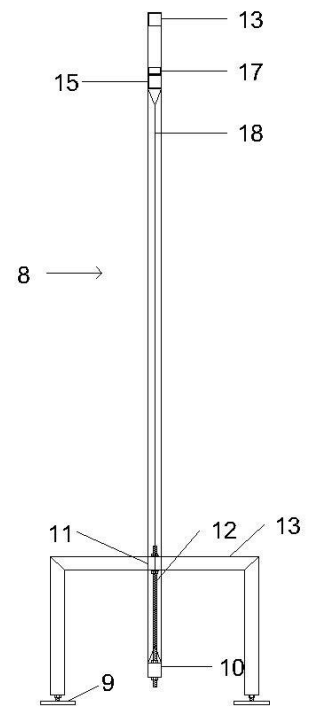


FIGURA 7

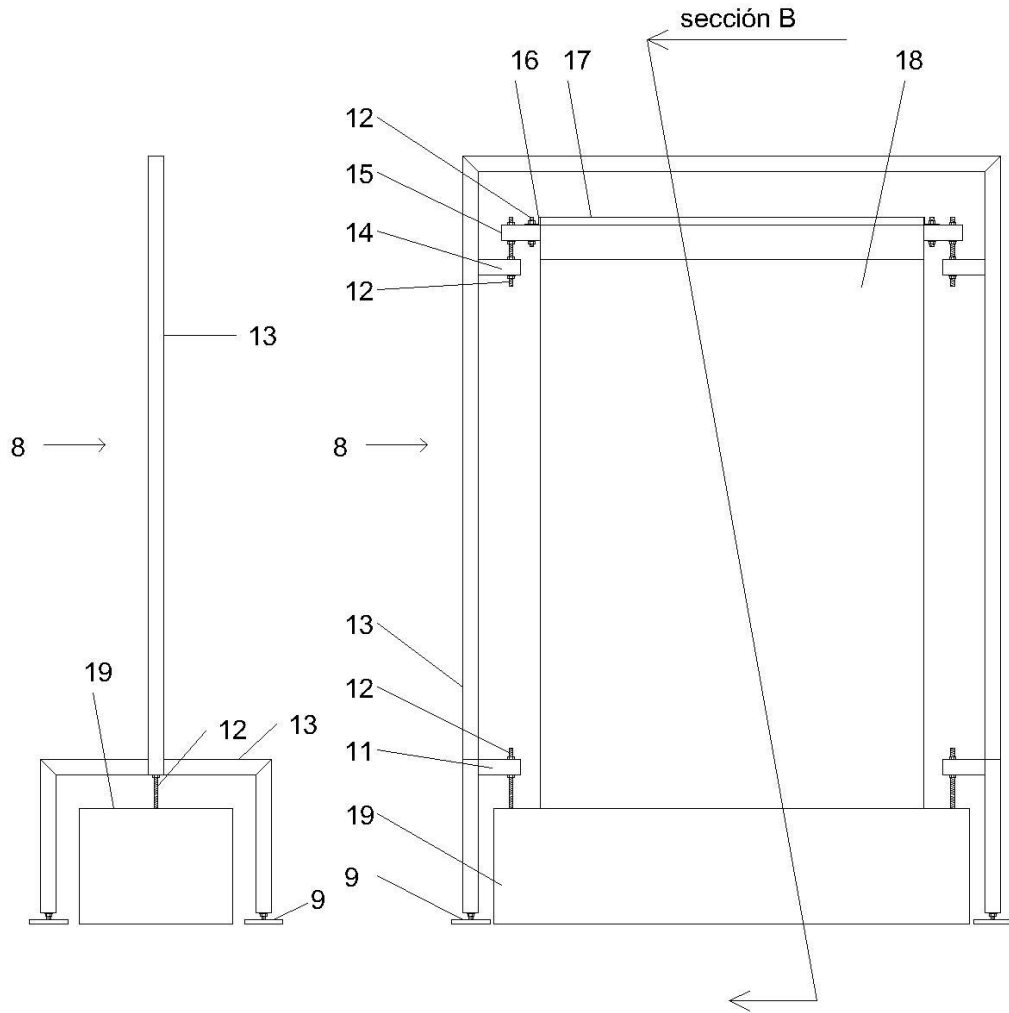


FIGURA 8

FIGURA 9

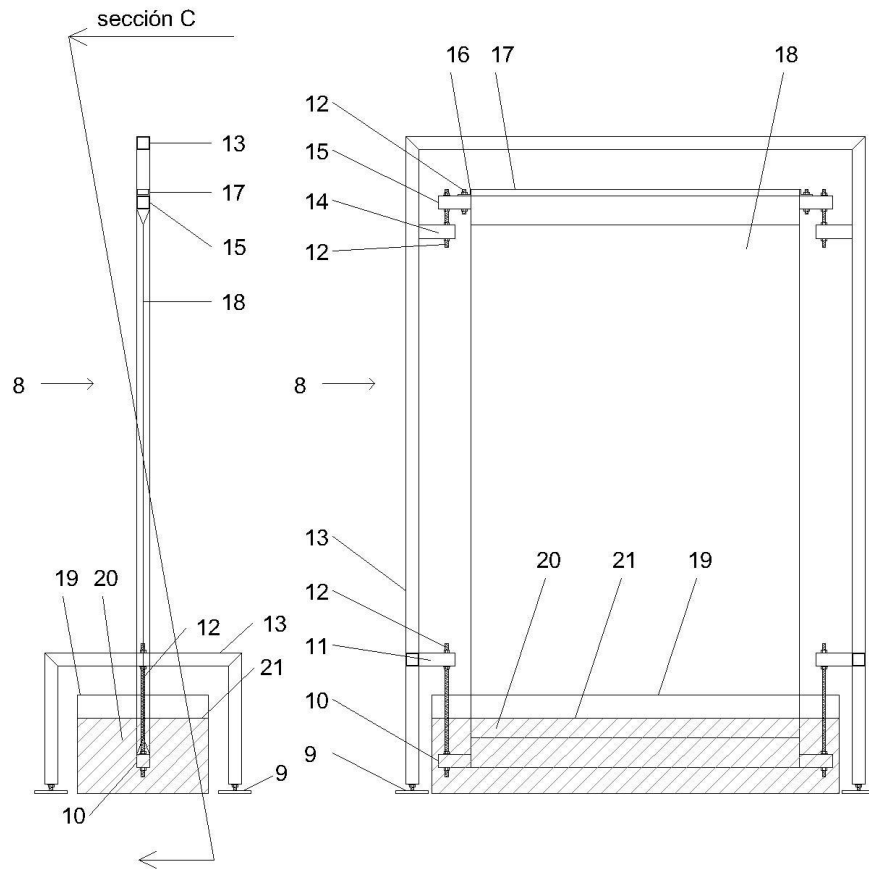


FIGURA 10

FIGURA 11

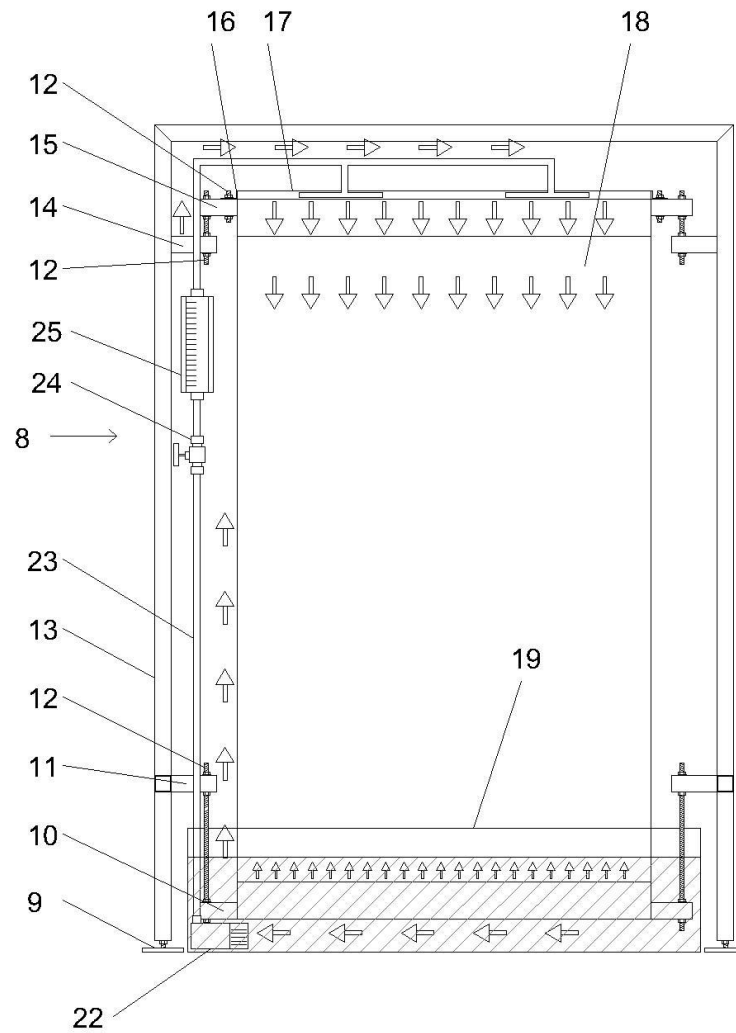


FIGURA 12