(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 953 468**

(51) Int. CI.:

C12M 1/00 (2006.01)
C12M 1/42 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.04.2017 PCT/FR2017/050765**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **12.10.2017 WO17174907**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2017 E 17721765 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2023 EP 3440185**

(54) Título: **Biorreactor selectivo para microalgas**

(30) Prioridad:

04.04.2016 FR 1652933

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.11.2023

(73) Titular/es:

INRIA - INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE EN INFORMATIQUE ET EN AUTOMATIQUE (50.0%)
Domaine de Voluceau Rocquencourt
78150 Le Chesnay, FR y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS (50.0%)

(72) Inventor/es:

MAIRET, FRANCIS;
BERNARD, OLIVIER;
BONNEFOND, HUBERT;
SCIANDRA, ANTOINE y
PRUVOST, ERIC

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Biorreactor selectivo para microalgas

La presente invención se refiere a un biorreactor para seleccionar cepas de microalgas. La invención también se refiere a un procedimiento para seleccionar cepas de microalgas.

Existen microorganismos fotosintéticos procarióticos y eucarióticos, comúnmente agrupados bajo el término microalgas. Los microorganismos fotosintéticos procarióticos están representados por cianobacterias (a veces denominadas "algas azul-verdes"). Los microorganismos fotosintéticos eucarióticos están representados por una multitud de clases entre las que se pueden citar las chlorohyceae, las diatomeas, las chrysophyceae, las coccolitophyceae, las euglenophyceae y las rhodophyceae. De manera general, el tamaño de una célula de microalga está comprendida entre 1 µm y 100 µm.

Se estima a día de hoy que existen más de un millón de especies de microalgas de las que son referenciadas unas decenas de miles de especies. Las microalgas son ubicuas y se encuentran tanto en agua dulce como en aguas salobres y marinas.

La producción de microalgas es un sector en que crece cada vez más. En efecto, las microalgas sintetizan numerosos productos de diferente naturaleza entre los que se pueden mencionar las proteínas, los antioxidantes, los pigmentos, los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga DHA (ácido docosahexaenoico) y EPA (ácido eicosapentaenoico).

Así, las microalgas encuentran aplicación en varios campos tecnológicos y en particular en la industria cosmética, la industria farmacéutica, la acuicultura, la industria de los alicamentos o de los complementos alimenticios.

Además, las microalgas se utilizan en la producción de bioenergía. Las microalgas tienen una capacidad de capturar la energía de la luz para establecer y metabolizar el carbono inorgánico a partir del dióxido de carbono (CO_2) en moléculas energéticas. El acoplamiento de las microalgas con el CO_2, y el hecho de que las microalgas son a menudo ricas en azúcares o aceites tienen como consecuencia que las microalgas son de gran interés para la producción de biocombustibles. Este acoplamiento también está en el origen de las capacidades depurativas que tienen las microalgas.

Las microalgas son especies fotosintéticas. Las células de microalgas necesitan luz para proliferar. Las microalgas se pueden cultivar con luz natural (luz solar) o luz artificial. Existen sistemas de cultivo abiertos como el tipo de tanque de cultivo (también denominado tanque "raceway") y sistemas de cultivo cerrados como biorreactores de alimentación por lotes, biorreactores de alimentación por lotes alimentados en discontinuo o biorreactores de alimentación por lotes alimentados en continuo.

De manera general, todos los sistemas de cultivo tienen un tanque destinado a recibir un medio de cultivo que comprende nutrientes. Las microalgas se dispersan en este medio de cultivo y reciben luz. Los biorreactores de alimentación en continuo tienen la ventaja de tener una entrada y una salida de medio de cultivo asociadas con un controlador. El controlador permite controlar el tanque de forma continua a una concentración escogida de microalgas en el medio de cultivo durante un tiempo de trabajo.

En los sistemas de cultivos abiertos o cerrados, la luz es absorbida principalmente por las células cercanas a la fuente de luz. Cuando la densidad de microalgas es alta, gran parte de la luz no logra penetrar profundamente en el tanque. Como consecuencia, las microalgas en lo profundo de los tanques se encuentran en la oscuridad y no pueden proliferar correctamente.

Los sistemas de cultivo tienen un problema de sobreexposición a la luz de las células cercanas a la fuente de luz y un problema de subexposición de las células situadas en lo profundo del medio de cultivo. Este gradiente de luz dentro de los sistemas de cultivo limita la producción de microalgas.

El estado de la técnica propone un enfoque que consiste en modificar genéticamente las microalgas. Se trata de reducir el tamaño o el número de antenas colectoras (moléculas de clorofila) y/o modificar las proporciones entre los diferentes pigmentos (en particular clorofila a, clorofila b, clorofila c, carotenoides y otros pigmentos) de las microalgas para hacerlas más transparente.

El documento WO 2014/089533 describe microalgas mutantes que tienen antenas colectoras reducidas.

En este enfoque, cada célula de microalga captura una menor cantidad de luz, lo que permite que la luz penetre en profundidad en los tanques. Las células situadas en las zonas más alejadas de la fuente de luz están por lo tanto menos sombreadas. Sin embargo, este enfoque requiere métodos complejos y costosos de ingeniería genética o de selección de mutaciones, tal como la mutagénesis química o el tratamiento con radiación ultravioleta o gamma. Por otro lado, los sistemas de cultivos incluyen sólo un tipo de mutante: se trata de monocultivos de microalgas. Los monocultivos son menos robustos, especialmente frente a las condiciones de explotación industrial. El estado de la

técnica también propone un enfoque que consiste en seleccionar cepas de microalgas ricas en componentes utilizados en la producción de biocombustibles.

El documento WO 2013/012329 describe un procedimiento para seleccionar microalgas que tienen una mayor capacidad de almacenamiento de componentes útiles para la producción de biocombustibles.

El documento US 2007/0231886 describe una instalación de reactor y un procedimiento para el cultivo de microorganismos fototrópicos. El documento US 5.882.849 describe un procedimiento para controlar el crecimiento de Hoemotococcus spp. El documento US 2014/0356902 describe un procedimiento para descubrir cepas de algas que tienen pigmentos reducidos para lograr una mayor eficiencia fotosintética. El documento KR 10200 4005 9182 describe un procedimiento para mejorar la productividad celular mediante la reducción de los pigmentos fotosintéticos de las células fotosintéticas.

En este enfoque, un cultivo de diferentes cepas de microalgas se somete a estrés nutricional. Sólo las cepas capaces de almacenar una alta concentración de nutrientes sobreviven a este estrés. Las cepas se recogen y se cultivan en los sistemas de cultivo descritos anteriormente. Los problemas relacionados al gradiente de luz persisten.

La presente invención mejora la situación.

Para ello, la invención introduce un biorreactor que comprende una fuente de luz, un sensor de luz enfrentado a dicha fuente de luz y un tanque dispuesto entre la fuente de luz y el sensor de luz destinado a recibir un medio de cultivo que comprende un cultivo celular de microorganismos fotosintéticos, un controlador unido al sensor de luz para controlar el tanque a una concentración de cultivo celular escogida en el medio de cultivo durante un tiempo de trabajo, siendo capaz dicha fuente de luz de emitir luz incidente de una intensidad de luz de entrada en la dirección del tanque, y siendo el sensor de luz capaz de medir una intensidad de luz de salida y de transmitir datos relativos a esta intensidad al controlador para controlar el tanque, y un control de la fuente de luz dispuesto para ajustar, durante un tiempo menor o igual a dicho tiempo de trabajo, la intensidad de luz de entrada a un valor de consigna que permite inducir estrés celular en al menos algunos de dichos microorganismos fotosintéticos tales como se definen en las reivindicaciones adjuntas.

El valor de consigna puede ser mayor o igual a 500 µmol quanta m^{-2} s^{-1}. Es preferiblemente mayor o igual a 800 µmol quanta m^{-2} s^{-1}. La concentración de cultivo celular escogida (x_i) en el medio de cultivo puede estar comprendida entre 0,001 g/l y 10 g/l.

Según una realización, la concentración de cultivo celular escogida (x_i) en el medio de cultivo está comprendida entre 0,001 g/l y 0,1 g/l, preferentemente entre 0,05 g/l y 0,1 g/l.

Según la invención, el control está dispuesto para ajustar dicha luz a una intensidad de luz de entrada (I_{in}) a un valor de reposo inferior al valor de consigna, y para cambiar entre el valor de reposo y el valor de consigna durante el tiempo de trabajo. El control está además dispuesto para establecer un primer tiempo de irradiación durante el cual la luz se ajusta en la intensidad de luz de entrada (I_{in}) al valor de reposo y un segundo tiempo de irradiación durante el cual la luz se ajusta al valor de consigna, siendo el primer tiempo de irradiación mayor que el segundo tiempo de irradiación, y para aplicar una sucesión de los primer y segundo tiempos de irradiaciones. Los primero y segundo tiempos de irradiaciones se ajustan de manera que el valor promedio de la intensidad de luz de entrada (I_{in}) durante el tiempo de trabajo calculado a partir del valor de reposo y el valor de consigna sea inferior o igual a un tercio de dicho valor de consigna. En una realización, el primer tiempo de irradiación es al menos tres veces superior al segundo tiempo de irradiación. El control se puede configurar para establecer una pluralidad de primero y segundo tiempos de irradiaciones durante los cuales la luz se ajusta en una intensidad de luz de entrada (I_{in}) al valor de reposo durante cada primer tiempo de irradiación y la luz se ajusta a una intensidad de luz de entrada (I_{in}) al valor de consigna durante cada segundo tiempo de irradiación. El control se puede configurar para establecer el valor de consigna en cada segundo tiempo de irradiación.

En otra realización, la concentración de cultivo celular seleccionada (x_i) en el medio de cultivo está comprendida entre 0,1 g/l y10 g/l, preferentemente entre 1 g/l y 10 g/l. En este modo, el control se puede configurar para mantener la intensidad de la luz de entrada (I_{in}) al valor de consigna para que la intensidad de la luz de salida (I_{out}) sea sustancialmente constante durante un tiempo inferior o igual al tiempo de trabajo.

La invención también se refiere a un procedimiento para seleccionar microorganismos fotosintéticos, que comprende las siguientes etapas:

1. Proporcionar un biorreactor que comprende una fuente de luz, y un tanque dispuesto frente a la fuente de luz destinado a recibir un medio de cultivo que comprende un cultivo celular de microorganismos fotosintéticos, siendo capaz dicha fuente de luz de emitir luz con una intensidad de luz de entrada I_{in} en dirección del tanque,

2. Llenar el tanque con un medio de cultivo;

3. Inocular el medio de cultivo con un cultivo celular compuesto por microorganismos fotosintéticos;

4. Controlar el tanque durante un tiempo de trabajo a una concentración de cultivo celular x_i seleccionada del medio de cultivo;

5. Ajustar la intensidad de la luz de entrada I_{in},, a un valor de consigna que permite inducir estrés celular en al menos algunos de dichos microorganismos fotosintéticos;

6. Mantener la intensidad de la luz de entrada I_{in},, al valor de consigna durante un tiempo inferior o igual a dicho tiempo de trabajo de manera a provocar una degradación celular de al menos una parte de dichos microorganismos fotosintéticos y así seleccionar los microorganismos fotosintéticos que tienen una mayor resistencia a la fotoinhibición; y

7. Recoger los microorganismos fotosintéticos que tienen una mayor resistencia a la fotoinhibición de dicho medio de cultivo tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

La recogida en la etapa 7 puede llevarse a cabo cuando el medio de cultivo comprende un cultivo celular de microorganismos fotosintéticos que consta de más de 75%, preferiblemente más de 90%, incluso más preferiblemente sustancialmente 100% de microorganismos que tienen una mayor resistencia a la fotoinhibición.

En una realización, el procedimiento implementa una repetición sucesiva de las etapas 5 y 6 hasta que se obtiene un cultivo celular de microorganismos fotosintéticos que consiste en microorganismos que tienen una mayor resistencia a la fotoinhibición.

Según la invención, la etapa 6 del procedimiento de la invención comprende las siguientes subetapas:

6a. Ajustar la luz a una intensidad de luz de entrada (I_{in}) a un valor de reposo inferior al valor de consigna durante un tiempo inferior a dicho tiempo de trabajo;

6b). Mantener la intensidad de la luz de entrada (I_{in}) al valor de reposo durante un tiempo inferior a dicho tiempo de trabajo; y

6c). Cambiar sucesivamente entre el valor de reposo y el valor de consigna durante el tiempo de trabajo, así como las subetapas definidas en las reivindicaciones.

El procedimiento de la invención puede comprender además las siguientes etapas:

8. Inocular un medio de cultivo con los microorganismos fotosintéticos recogidos en la etapa 7 en un biorreactor; y

9. Controlar el biorreactor de la etapa 8 para una producción de biomasa que consiste en dichos microorganismos fotosintéticos.

El biorreactor utilizado en el procedimiento puede comprender además un sensor de luz dispuesto a la opuesta de la fuente de luz con respecto al tanque, siendo capaz el sensor de luz de medir una intensidad de luz de salida (I_{out}). En esta realización, el procedimiento comprende además la etapa 4a para medir la intensidad de la luz de salida (I_{out}). En esta realización, la intensidad de la luz de entrada (I_{in}) en la etapa 5 se ajusta en función de la intensidad de la luz de salida (I_{out}) medida en la etapa 4a.

Otras ventajas y características de la invención aparecerán con la lectura de la descripción detallada a continuación y con los dibujos adjuntos en los que:

- La Figura 1 muestra un esquema de producción de microalgas en un sistema de cultivo;
- la Figura 2 muestra un esquema de principio del biorreactor de la invención durante un tiempo de trabajo;
- la Figura 3 muestra un esquema de principio del biorreactor de la Figura 2 al final del tiempo de trabajo;
- la Figura 4 muestra un diagrama en el que aparece la opacidad de una cepa salvaje de microalgas y la opacidad de una cepa seleccionada por el biorreactor de la invención; y
- la Figura 5 muestra la producción de biomasa de la cepa salvaje y la cepa seleccionada de la Figura 4.

Los dibujos y la descripción a continuación contienen, por lo esencial, elementos con carácter certero. Forman parte integrante de la descripción, por lo que no sólo pueden servir para comprender mejor la presente invención, sino también contribuir a su definición, llegado el caso.

Para una buena producción de microalgas (o biomasa de microalgas) conviene cultivarlas en un medio de cultivo rico en nutrientes (nitrógeno, fósforo, azufre, oligoelementos, vitaminas) y aportar suficiente luz. La presencia de nutrientes es necesaria para permitir que las microalgas conviertan la energía luminosa al metabolizar el CO_2. Esta conversión tiene como consecuencia la producción de oxígeno y el aumento de la biomasa por la proliferación de microalgas (multiplicación por división celular).

Convencionalmente, se utiliza una fuente de luz capaz de emitir luz a una longitud de onda fuertemente absorbida por las microalgas, con el fin de obtener una alta tasa de crecimiento.

Las publicaciones Light requirements in microalgal photobioreactors: on overview of biophotonic aspects - Carvalho et al., Appl Microbiology and Biotechnology, 2011, vol. 89, no. 5: 1275-1288 y Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production - Schulze et al., Trends in Biotechnology, 2014, vol. 32, no. 8: 422-430 describen el uso de la luz en los sistemas de cultivo de microalgas para obtener un buen crecimiento celular.

En un biorreactor, las microalgas pueden recibir un exceso de fotones que pueden provocar una bajada de la eficiencia fotosintética. Esto corresponde a una disipación de la energía denominada disipación no fotoquímica (en inglés: non-photochemical quenching). El fenómeno de la disipación no fotoquímica se describe en particular en la publicación Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy - Müller et al., Plant Physiol, 2001, vol.125, no. 4: 1558-1566. Además, el exceso de absorción de fotones puede provocar una degradación del aparato fotosintético que disminuye, o incluso inhibe, la proliferación de microalgas. Este fenómeno se denomina fotoinhibición.

La Figura 1 muestra un esquema de producción de biomasa de microalgas en un biorreactor de alimentación en continuo.

El biorreactor comprende un tanque 100 capaz de recibir un medio de cultivo que comprende microalgas. Las microalgas se encuentran dispersas en el medio de cultivo o en forma de biopelícula. Las microalgas están formadas por células C de microorganismos fotosintéticos. El biorreactor comprende una entrada 102 y una salida 104 respectivamente asociadas con un dispositivo de control de flujo. Así, la entrada 102 y la salida 104 están respectivamente asociadas a una primera válvula (o bomba) 106 y una segunda válvula (o bomba) 108 para abrir y cerrar la entrada 102 y la salida 104. La entrada 102 y la primera válvula 106 permiten controlar el suministro de medio de cultivo fresco en el tanque 100. La salida 104 y la segunda válvula 108 permiten controlar la evacuación del medio de cultivo y, llegado el caso, de al menos algunas de las células C. La entrada y la salida permiten controlar en continuo el biorreactor para una producción P de biomasa de microalgas.

En términos generales, el control de la producción de biomasa en un sistema de cultivo de alimentación en continuo se basa en el control del crecimiento celular del cultivo de microalgas. La concentración x [g/l] de microalgas en el medio de cultivo evoluciona en función de la tasa de crecimiento específica $\mu(x)$ [h^{-1}] y de la tasa de dilución D [h^{-1}] del medio de cultivo. La tasa de dilución D se define por el flujo de entrada (l/h) dividido por el volumen (l) del medio de cultivo.

La concentración x [g/l] de microalgas en el medio de cultivo evoluciona a lo largo del tiempo. Para una determinada cepa de microalgas, esta evolución se puede expresar mediante la siguiente fórmula F1:

$$\dot{x} = \mu x - D x \qquad [F1]$$

En consecuencia, para la producción de biomasa en el tanque 100 del biorreactor (a volumen constante):

- Si $\mu(x) > D$: las células se multiplican (por división celular) más rápido de lo que son evacuadas, su número y por lo tanto su concentración (biomasa) aumentará.
- Si $\mu(x) < D$: las células se multiplican (por división celular) menos rápido de lo que son evacuadas, su número y por lo tanto su concentración (biomasa) disminuirá.
- Si $\mu(x) = D$: el número de células permanece constante a lo largo del tiempo. El número de células evacuadas con el medio de cultivo del tanque es igual al número de células obtenidas por su multiplicación en el medio de cultivo dentro del tanque. La concentración es estable.

El biorreactor comprende una fuente de luz 200. La fuente de luz 200 es capaz de emitir luz incidente L. La luz L se escoge típicamente para cubrir todo el espectro solar que incluye la luz azul (preferiblemente de 430 nm a 470 nm) y roja (preferiblemente de 650 nm a 700 nm). Estos intervalos de longitudes de ondas permiten una buena tasa de crecimiento de las microalgas ya que son fuertemente absorbidas por ellas.

Los fenómenos de óptica, de absorbancia y metabolización de fotones en un tanque de biorreactor se detallan en los trabajos Microalgal biotechnology: potential and production, C. Posten y C. Walter, de Gruyter, 2012 y Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology, 2ª edición , A. Richmond y Q. Hu, Wiley-Blackwell, 2013.

La luz incidente L ilumina esencialmente las células de microalgas cercanas a la fuente de luz 200. Estas microalgas reciben la mayoría de los fotones emitidos por la fuente de luz 200. Esto induce el fenómeno de disipación no fotoquímica NPQ (en inglés: Non-Photochemical Quenching), y también fotoinhibición. Las células de microalgas ubicadas en lo profundo del tanque 100 no están iluminadas, o casi nada, lo que les impide proliferar. Esto se aplica especialmente a una alta densidad celular, es decir, cuando la concentración de microalgas en el tanque 100 es alta (por ejemplo, entre 1 g/l y 10 g/l).

La producción P de biomasa resultante no es satisfactoria. Para responder a este problema, ciertos sistemas de cultivo del estado de la técnica utilizan herramientas de mezcla mejoradas que favorecen la circulación de las microalgas dentro del tanque. De esta forma, todas las células quedan expuestas a la luz.

Sin embargo, el uso de estas herramientas presenta un coste energético importante y no se resuelven los problemas existentes relacionados con la fotoinhibición y el gradiente de luz.

La presente invención propone un enfoque radicalmente diferente. Así, en lugar de intentar evitar los efectos de la fotoinhibición, la invención propone convertirla en una ventaja.

La Solicitante ha descubierto, no sin sorpresa, que en un sistema de cultivo, la fotoinhibición permite seleccionar microalgas que convienen para la explotación industrial. El sistema puede ser controlado de forma continua o semicontinua de tipo *fed-batch*.

Algunas especies de microalgas son capaces de ajustar su contenido en pigmentos fotorreceptores según la luz recibida. Este fenómeno se denomina fotoaclimatación. Las microalgas expuestas a una alta intensidad de luz se aclimatan a esta alta intensidad de luz y se vuelven más translúcidas. Las microalgas se vuelven notablemente más translúcidas al reducir la presencia de pigmentos fotorreceptores dentro de las células. Las células de microalgas se vuelven así más resistentes a la fotoinhibición. Se conoce, por ejemplo, la especie *Chlorella sorokiniana* que tiene una mayor resistencia a la fotoinhibición, véase Chlorella sorokiniana UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-tolérant microalga with potential for removing ammonium from wastewater - Bashan, L. E., Trejo, A., Huss, V. A., Hernandez, J. P., & Bashan, Y., Bioresource Technology, 99(11), 4980-4989, 2008. De manera general, la resistencia a las altas intensidades de luz puede provenir de la capacidad de ciertas especies para disminuir su contenido de pigmento. En los sistemas de cultivo, estas microalgas translúcidas dejan pasar gran parte de la luz incidente al fondo del tanque. El problema relacionado con el gradiente de luz en el tanque es limitado, incluso resuelto.

Sin embargo, hoy en día se conocen pocas especies con mayor resistencia a la fotoinhibición.

Por otro lado, cuando estas especies de microalgas se exponen a una baja intensidad de luz, se aclimatan a esta baja intensidad de luz y se vuelven más opacas. Así, en sistemas de cultivo de alta densidad, por ejemplo una concentración de microalgas superior a 0,1 g/l, la intensidad de luz media en la profundidad del tanque es baja. En consecuencia, las microalgas pierden el beneficio de su transparencia adquirida durante la exposición a una alta intensidad de luz.

Un objetivo de la invención es por lo tanto en particular generar nuevas cepas de microalgas que, incluso con poca luz (con poca intensidad de luz), tengan un bajo contenido en pigmentos y/o proceden a una modificación del aparato pigmentario. Biomasas más importantes en los sistemas de cultivo pueden entonces ser obtenidas. De manera general, un estrés por luz da como resultado una adaptación de las células de las microalgas. Esta adaptación se refleja en particular en mutaciones genéticas dentro de las células de las microalgas. En otras palabras, las mutaciones genéticas naturales inducidas por el estrés de luz conducen a mecanismos de adaptación genética. Las mutaciones genéticas son susceptibles de ser transmitidas de una célula a sus descendientes y, por lo tanto, transmitirse de generación en generación. Una mutación genética puede, por ejemplo, resultar en una disminución del contenido de fotorreceptores (tal como la clorofila) en las células de las microalgas. También puede dar lugar a un aumento de la velocidad de reciclado de los pigmentos, y por lo tanto de su producción/degradación activa, o incluso a una modificación de las proporciones de los diferentes pigmentos en la célula. De esta manera, las microalgas se vuelven más translúcidas y dejan pasar gran parte de la luz incidente, lo que restringe o resuelve el problema relacionado con el gradiente de luz en los tanques de los sistemas de cultivo.

La Figura 2 muestra un esquema de principio del biorreactor de la invención durante un tiempo de trabajo.

El biorreactor comprende un tanque 100 con un medio de cultivo. El medio de cultivo comprende una dispersión de un cultivo celular de microorganismos fotosintéticos. El cultivo celular comprende n cepas diferentes de microorganismos fotosintéticos (se entiende por "cepas diferentes" diferentes genotipos o fenotipos de una o más especies de microalgas) de concentraciones respectivas x1, x2, x3...xn. Las diferentes cepas de microorganismos

fotosintéticos son más o menos resistentes a la fotoinhibición. El tanque 100 tiene medios para mezclar el medio de cultivo.

El biorreactor comprende además una entrada 102 y una salida 104. La entrada 102 permite aportar medio de cultivo fresco en el depósito 100. La salida 104 permite evacuar el medio de cultivo y las microalgas del depósito 100.

La entrada 102 y la salida 104 están asociadas a un controlador 400. El controlador 400 permite controlar el depósito 100 de forma continua durante un tiempo de trabajo. El tiempo de trabajo varía según las cepas de microalgas presentes en el medio de cultivo. El tiempo de trabajo se extiende preferentemente al menos durante 1 mes (sin límite superior de tiempo) lo que corresponde generalmente a al menos 20 generaciones de microalgas (es decir 20 divisiones celulares sucesivas). Según la invención, el tiempo de trabajo es superior al tiempo necesario para un ciclo celular de las microalgas. En una realización, el tiempo de trabajo se extiende de 6 a 12 meses.

El controlador 400 controla el tanque 100 de forma continua a una tasa de dilución *D*. Para ello, el controlador 400 comprende una o más células fotoeléctricas para medir la densidad óptica del conjunto medio de cultivo/microalgas dentro del tanque 100. De esta manera, el controlador puede mantener la concentración de cultivo celular Σx_i en el medio de cultivo entre 0,001 g/l y 10 g/l, preferiblemente entre 0,05 g/l y 0,1 g/l o entre 0,1 y 5 g/l, durante el tiempo de trabajo y adaptar la tasa de dilución *D* aportando y evacuando del medio de cultivo. En otras palabras, la concentración total que consiste en las respectivas concentraciones $x_1, x_2, x_3...x_n$ de las diferentes cepas de microalgas está comprendida entre 0,05 g/l a 0,1 g/l durante el tiempo de trabajo. Esta concentración permite una buena difusión de la luz dentro del tanque 100.

El biorreactor comprende una fuente de luz 200 que emite luz incidente L con una intensidad de luz de entrada I_{in} suficientemente alta para pasar atravesar el tanque 100 lleno del medio de cultivo que comprende la dispersión de microalgas. En la presente realización, la fuente de luz 200 es capaz de emitir una intensidad de luz de entrada I_{in} que puede llegar hasta 5000 µmol quanta m^{-2} s^{-1}.

El biorreactor comprende además un sensor de luz 300 dispuesto frente a dicha fuente de luz para medir la intensidad luminosa de la luz L que ha atravesado el tanque 100. La intensidad de la luz que ha atravesado el tanque 100 lleno de medio de cultivo que comprende la dispersión de microalgas se denomina como intensidad de luz de salida I_{out}. El sensor de luz 300 mide la intensidad de la luz de salida I_{out} y transmite los datos al controlador 400 para controlar el tanque. La transmisión se puede realizar directa o indirectamente a través de un control 500 que se describe a continuación.

Un control 500 está conectado a la fuente de luz 200 y permite mantener constante, aumentar o disminuir la intensidad de la luz de entrada Iin. El control 500 está dispuesto para ajustar la intensidad de la luz de entrada Iin a un valor de consigna. En la realización descrita aquí, el control 500 también está conectado al sensor de luz 300. El enlace con el sensor de luz 300 permite que el control 500 reciba datos relacionados con la intensidad de la luz de salida I_{out} medida por el sensor 300. El control 500 puede así transmitir estos datos al controlador 400 para que este último pueda controlar el tanque de forma continua a la concentración de consigna.

La intensidad de la luz de entrada I_{in} y la intensidad de la luz de salida I_{out} puede variar durante el tiempo de trabajo. Así, el control 500 está dispuesto para ajustar la intensidad de la luz de entrada I_{in} al valor de consigna durante un tiempo menor o igual al tiempo de trabajo.

La relación en función del tiempo entre la intensidad de la luz de entrada I_{in} y la intensidad de la luz de salida I_{out} se define mediante la siguiente fórmula F2:

$$I_{\text{sal}}\ (t) = I_{\text{ent}}(t)\exp\left(-\sum_{i=1}^{n} a_i x_i P\right) \qquad [\text{F2}]$$

en la que a_i es el coeficiente de atenuación de las microalgas (es decir, la cantidad de luz absorbida por las microalgas); x_i es la concentración de microalgas; y P es la distancia entre la fuente de luz 200 y el sensor de luz 300.

Regulando la intensidad de la luz de entrada I_{in} el control 500 también puede controlar la intensidad de la luz de salida I_{out}.

Según la invención, el control 500 está dispuesto para ajustar la intensidad de la luz de entrada I_{in} a un valor de consigna durante un tiempo inferior o igual a dicho tiempo de trabajo para inducir estrés celular en al menos algunas de las microalgas presentes en el cultivo celular. En un modo preferido, el control 500 está dispuesto para ajustar la intensidad de la luz de entrada I_{in} a un valor de consigna mayor o igual a 500 µmol quanta m^{-2} s^{-1}.

El control 500 está dispuesto para recibir datos relacionados con el valor de consigna. El valor de consigna puede variar en particular en función de una o más especies de microorganismos fotosintéticos presentes en el tanque 100. El valor de consigna también puede variar en función de la concentración de cultivo celular x_i en el medio de cultivo.

El valor de consigna puede evolucionar durante el tiempo de trabajo. En una realización, el tiempo de trabajo se compone de una sucesión de distintos intervalos de tiempo predefinidos. Cada intervalo es menor que el tiempo de trabajo. En este modo, el control 500 puede ajustar la intensidad de la luz de entrada (I_{in}) al valor de consigna durante cada uno de dichos intervalos de tiempo. El valor de consigna se puede configurar específicamente para cada intervalo. El valor de consigna puede ser por lo tanto diferente de un intervalo a otro. En un modo preferido, el valor de consigna aumenta de un intervalo al siguiente, por ejemplo en pasos de 100 a 200 µmol quanta m^{-2} s^{-1}. Los intervalos pueden ser de la misma duración o de diferentes duraciones.

En otra realización, el control 500 puede controlar la intensidad de la luz de entrada I_{in} en función de los datos relativos de la intensidad de la luz de salida I_{out} medida por el sensor 300. En este modo, el control 500 se puede configurar para recibir datos del sensor 300, después ajustar en función de los datos recibidos la intensidad de la luz de entrada I_{in} al valor de consigna deseado.

El control 500 se puede configurar para mantener la intensidad de la luz de entrada (I_{in}) a un valor de consigna para que la intensidad de la luz de salida (I_{out}) es sustancialmente constante durante un tiempo inferior o igual al tiempo de trabajo.

En una realización, la intensidad de la luz de salida (I_{out}) puede ser sustancialmente constante durante todo el tiempo de trabajo. En este modo, el control 500 regula por lo tanto la intensidad de la luz de entrada (I_{in}) al valor de consigna y lo mantiene durante todo el tiempo de trabajo. La intensidad de la luz (I_{in}) se ajusta, por ejemplo, en función de la concentración de cultivo celular x_i en el medio de cultivo. Cuanto mayor sea la concentración, más aumentará la intensidad de la luz (I_{in}) para mantener la intensidad de la luz de salida (I_{out}) constante.

En otra realización, la intensidad de la luz de salida (I_{out}) es sustancialmente constante durante un tiempo predefinido inferior al tiempo de trabajo. En este modo, el control 500 regula la intensidad de la luz de entrada (I_{in}) al valor de consigna durante este tiempo predefinido (por ejemplo también en función de la evolución de la concentración de células en el medio).

En otra realización más, la intensidad de la luz de salida (I_{out}) es sustancialmente constante durante distintos intervalos de tiempo predefinidos, siendo cada intervalo de tiempo predefinido inferior al tiempo de trabajo. En este modo, el control 500 ajusta la intensidad de la luz de entrada (I_{in}) al valor de consigna durante cada uno de dichos intervalos de tiempo. El valor de consigna se puede configurar específicamente para cada uno de los intervalos. El valor de consigna puede ser por lo tanto diferente de un intervalo a otro. En un modo preferido, el tiempo de trabajo se compone de una sucesión de intervalos. El valor de consigna evoluciona a lo largo de dicho tiempo de trabajo y aumenta en pasos de 100 a 200 µmol quanta m^{-2} s^{-1} para cada intervalo. Los intervalos pueden ser de la misma duración o de diferentes duraciones.

El hecho de inducir estrés celular en ciertas microalgas tiene al menos dos consecuencias:

- una primera consecuencia es que ciertas microalgas afectadas por estrés celular pueden verse afectadas por el fenómeno de fotoinhibición. Algunas proteínas clave del aparato fotosintético se dañan y el crecimiento se ralentiza. El fenómeno puede llegar hasta la detención del ciclo celular; dejan de dividirse o sufren muerte celular;

- una segunda consecuencia es que otras microalgas afectadas por estrés celular pueden adaptarse a nivel genético (en particular mediante mutaciones puntuales de nucleótidos). Están menos dañadas y el ciclo celular de estas microalgas no se detiene; muestran una mayor resistencia a la fotoinhibición. Como se explicó anteriormente, esta resistencia está relacionada con el hecho de que estas microalgas se vuelven más transparentes (bajo contenido de pigmentos).

El controlador 400 controla el tanque 100 de forma continua a una tasa de dilución D durante el tiempo de trabajo muy superior que el tiempo requerido para un ciclo celular de microalgas.

En consecuencia, el tanque 100 se vacía gradualmente de las células de microalgas afectadas por la primera consecuencia. En efecto, las células afectadas dejan de dividirse y su crecimiento específico se vuelve entonces inferior a la tasa ($\mu(x) < D$).

Por el contrario, las células de microalgas afectadas por la segunda consecuencia quedan representadas durante todo el tiempo de trabajo en el tanque 100 ya que su crecimiento específico ($\mu(x)$) no se ve afectado, o sólo levemente.

Por otro lado, las células de las cepas de microalgas que tienen una mayor resistencia a la fotoinhibición y que ya estaban presentes en el cultivo celular también quedan representadas en el tanque 100 durante todo el tiempo de trabajo. Su crecimiento específico ($\mu(x)$) no se ve afectado, o sólo levemente.

Preferiblemente, el tiempo de trabajo es superior que el tiempo requerido para al menos 20 ciclos celulares, preferiblemente 100 ciclos celulares, de cada célula de microalga inicial presente en el medio de cultivo. En la presente realización, el tiempo de trabajo es de 20 días y preferiblemente de 100 días.

En una realización, el control 500 está dispuesto para ajustar la luz a una intensidad de luz de entrada en un valor de reposo I_{in0}. Así, el control 500 cambia sucesivamente entre una luz de intensidad ajustada al valor de reposo y una luz de intensidad ajustada al valor de consigna.

En una realización, el valor de reposo es menor o igual a 100 µmol quanta m^{-2} s^{-1}. Así, el control 500 puede cambiar sucesivamente durante el tiempo de trabajo, entre la luz incidente de una intensidad I_{in0} menor o igual a 100 µmol quanta m^{-2} s^{-1} (denominada como “baja intensidad”) y una intensidad I_{in1} mayor o igual a 500 µmol quanta m^{-2} s^{-1} (denominada como “alta intensidad”). El tiempo de conmutación T es menor que el tiempo de trabajo (típicamente entre 30 minutos y 1 hora). Así, el control 500 puede cambiar entre la luz de intensidad de luz de entrada I_{in1} (denominada como “alta intensidad”), por una fracción p del tiempo, induciendo un estrés celular, y la luz de baja intensidad I_{in0}, durante una fracción (1-p) del tiempo. La fracción p es típicamente inferior o igual a 0,1. Así, el control 500 puede establecer un primer tiempo de irradiación a baja intensidad por una duración $(1-p).T$ y un segundo tiempo de irradiación de alta intensidad por una duración $p.T$.

La luz promedia percibida por las células para un cultivo de baja densidad es entonces

$$\bar{I}_{\text{ent}} = p.I_{\text{ent1}} + (1-p).I_{\text{ent0}}$$

Los parámetros anteriores se escogen y/o adaptan según la especie de microalgas. La elección se lleva a cabo de manera que, por un lado, durante las fases de alta intensidad, se induzca el estrés celular de al menos algunas de las microalgas presentes en el cultivo celular, y por otro lado, las células se aclimaten a una luz promedia I_{in} baja, reflejando condiciones de cultivo de alta densidad, estarán así en condiciones de máxima síntesis de pigmentos.

Según la invención, los tiempos de irradiación se fijan de modo que el valor medio de la intensidad luminosa de entrada (I_{in}) durante el tiempo de trabajo calculado a partir del valor de reposo y el valor de consigna sea inferior o igual a un tercio de dicho valor de consigna. En un modo preferencial, el primer tiempo de irradiación es al menos tres veces mayor que el segundo tiempo de irradiación. Se puede definir una pluralidad de primeros y segundos tiempos de irradiación. Durante la pluralidad de primeros y segundos tiempos de irradiaciones, la luz se puede ajustar a una intensidad de luz de entrada (I_{in}) al valor de reposo durante cada primer tiempo de irradiación y la luz se ajusta a una intensidad de luz de entrada (I_{in}) al valor de consigna durante cada segundo tiempo de irradiación. El valor de consigna se puede establecer para cada segundo tiempo de irradiación. De esta forma el valor de consigna puede variar a lo largo del tiempo de trabajo.

En otra realización, el control 500 ajusta la intensidad de la luz de entrada I_{in} para que la intensidad de la luz de salida I_{out} sea sustancialmente constante a un valor lo suficientemente alto como para inducir la fotoinhibición. Por ejemplo, este valor puede ser mayor o igual a 500 µmol quanta m^{-2} s^{-1}. En esta realización, durante todo el tiempo de trabajo, las células de microalgas próximas a la fuente de luz 200 son sometidas a una fuerte intensidad, es decir sometidas a una luz de intensidad ajustada a un valor de consigna que permite inducir estrés celular en las microalgas. Al menos una parte de las células de microalgas del cultivo celular está por lo tanto constantemente sometida a estrés celular. Esta realización es particularmente ventajosa para identificar cepas que tienen una mayor resistencia a la fotoinhibición que inicialmente estaban contenidas en la diversidad inicial de la población de microalgas o bien que aparecieron por un proceso de mutación genética durante el tiempo de trabajo. En una realización, el tiempo de trabajo es de 6 meses; la intensidad de la luz de salida I_{out} es de 1000 µmol quanta m^{-2} s^{-1}; y la tasa de dilución es de 0,3 j^{-1}.

Como se explicó anteriormente, en esta realización el valor de consigna puede evolucionar por pasos durante el tiempo de trabajo.

La Figura 3 muestra un esquema de principio del biorreactor de la Figura 2 de la invención al final del tiempo de trabajo.

El medio de cultivo en el tanque 100 comprendía inicialmente una dispersión de un cultivo celular de microalgas que comprende una variabilidad natural de individuos más o menos resistentes a la fotoinhibición de las respectivas concentraciones $x_1, x_2, x_3...x_n$,, siendo las diferentes cepas de microalgas más o menos resistentes a la fotoinhibición (véase la Figura 2).

Al final del tiempo de trabajo, el tanque 100 comprende una dispersión de un cultivo celular de microalgas que tiene una concentración x_{sel} de una o más cepas de microalgas que tienen cada una una mayor resistencia a la fotoinhibición. El controlador está dispuesto para adaptar la tasa de dilución D durante el tiempo de trabajo. En una realización, la

concentración x_{sel} es sustancialmente idéntica a la de la concentración x_i inicial, es decir, está comprendida entre 0,05 g/l a 0,1 g/l. El controlador 400 permite cerrar la entrada 102 y la salida 104 para recoger la o las cepas de microalgas con mayor resistencia a la fotoinhibición. La recogida se puede realizar en particular mediante extracción en el tanque 100.

El biorreactor de la invención permite por lo tanto obtener microorganismos fotosintéticos con mayor resistencia a la fotoinhibición. Se entiende por mayor resistencia una ligera disminución de la tasa de crecimiento (del orden de -25%) para una intensidad de luz dos veces mayor que la intensidad de crecimiento óptima.

Cuanto más fuerte sea la intensidad de la luz, más estricta será la selección. Ventajosamente, el nivel de estrés aumenta gradualmente durante el tiempo de trabajo. Esto se puede lograr aumentando la intensidad de luz promedia durante el tiempo de trabajo, en particular aumentando la intensidad de consigna durante el tiempo de trabajo.

El funcionamiento del biorreactor de la invención es independiente del número de cepas de microalgas presentes en el medio de cultivo. En otras realizaciones, puede tratarse de un monocultivo, es decir, un cultivo que comprende sólo una cepa de microalgas. En estas realizaciones, las células de microalgas pueden adaptarse o transformarse mediante el biorreactor de la invención, por ejemplo mediante mutaciones puntuales a nivel de sus secuencias de nucleótidos.

EJEMPLO

El ejemplo usa un biorreactor que tiene una pluralidad de sondas y sensores. El biorreactor comprende en particular una sonda para medir el pH y la temperatura del medio de cultivo, un sensor PAR para medir la radiación fotosintética, una sonda de turbidez para medir la densidad óptica a 750 nm, un sensor fluorescente de oxígeno para medir la tasa de respiración y un sensor de atenuación de luz formado por un fotodiodo que capta la luz I_{in} o una fuente adicional como un LED o un haz láser.

El biorreactor también cuenta con un sensor de nivel de tipo barrera láser de 600 nm. El biorreactor está acoplado con el Simulador de Ambiente Marino Controlado por Ordenador (SEMPO) que permite reproducir experimentalmente el entorno de un medio marino favorable para la proliferación de microalgas, véase The effects of a controlled fluctuating nutrient environment on continuous cultures of phytoplankton monitored by computers - Bernard, O., Malara, G., & Sciandra, A., Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 197(2), 263-278, 1996, et An automatic device for in vivo absorption spectra acquisition and chlorophyll estimation in phytoplankton cultures - Le Floc'h, E., Malara, G., & Sciandra, A., Journal of applied phycology, 14(6), 435-444, 2002. El biorreactor también está acoplado al autoanalizador TECHNICON que permite establecer las condiciones de concentración de nutrientes (NO_2 y NO_3). El biorreactor también está acoplado a un contador de partículas de la empresa HIAC (marca registrada) que permite monitorear la producción de biomasa.

El pH del medio de cultivo se regula durante el tiempo de trabajo mediante un generador de cortina de burbujas de aire y de CO_2 dentro del medio de cultivo. La temperatura del medio de cultivo está regulada por un termostato que incluye la circulación de agua a una temperatura determinada alrededor del tanque del biorreactor. La fuente de luz comprende rampas de iluminación y/o filtros de luz que permiten iluminar según diferentes intensidades de luz. La aportación de nutrientes del cultivo celular se controla mediante una dilución del medio de cultivo, que es función de la medición de la turbidez. Los nutrientes necesarios para la producción de biomasa se pueden añadir de forma continua o con una frecuencia variable.

El tanque está hecho principalmente de acero inoxidable con un volumen de 1,9 litros. El tanque tiene dos fachadas de plexiglás (intercambiables con fachadas de policarbonato). Una primera fachada está dispuesta cerca de la fuente de luz de manera que la luz pueda penetrar dentro del tanque para iluminar el cultivo celular. Una segunda fachada está dispuesta cerca del sensor de luz de manera que este último pueda medir la intensidad de la luz de salida.

La fuente de luz comprende una rampa de luz de diodos electroluminiscentes (LED) de alta potencia. La fuente de luz es capaz de emitir luz con una intensidad luminosa de 5000 µmol fotones m^{-2} s^{-1}.

El tiempo de trabajo es de 6 meses. El cultivo celular consiste en una cepa salvaje de células de *Tisochrysis lutea*.

Los ciclos consisten en periodos de aproximadamente 30 minutos a alta intensidad I_{in1} (fases de estrés) seguidos de 90 minutos en la oscuridad I_{in0} (fase de reposo). La fuerte intensidad de luz I_{in1} es de 800 µmol fotones m^{-2} s^{-1} al comienzo del tiempo de trabajo, después se aumentó por palier a lo largo de los ciclos hasta 1600 µmol fotones m^{-2} s^{-1}. La Tabla 1 a continuación muestra los detalles de cada ciclo:

Tabla 1: parámetros de los ciclos de selección aplicados. I_{in1} : Luz a una intensidad ajustada al valor de consigna; I_{medio}: Intensidad de luz promedia durante un ciclo; t_{in1} = Tiempo por intervalo [es decir, Tiempo de irradiación de alta intensidad de luz (o segundo tiempo de irradiación con intensidad ajustada al valor de consigna)]; t_{in0} = Tiempo por intervalo en I_{in0} [es decir. Tiempo de reposo o tiempo de irradiación a baja intensidad de luz (o primer tiempo de irradiación con intensidad ajustada al valor de reposo)].

	I_{in1} (µmol.m^{-2}.s^{-1})	I_{medio} (µmol.m^{-2}.s^{-1})	I_{in1}-I_{medio} (µmol.m^{-2}.s^{-1})	t_{in1} (segundo)	t_{in0} (segundo)	**Número de intervalo** (día^{-1})
Ciclo 1	800	200	600	1800	3600	16
Ciclo 2	1000	300	700	2160	5040	12
Ciclo 3	1200	350	850	2100	5100	12
Ciclo 4	1400	350	1050	1800	5400	12
Ciclo 5	1600	400	1200	1800	5400	12

Aquí, la diferencia I_{in1}-I_{medio} se escoge para que sea al menos mayor que 400 (µmol.m^{-2}.s^{-1} o para que I_{medio} sea menor de un tercio de I_{in1}.

La Figura 4 muestra la opacidad de la cepa salvaje de *Tisochrysis lutea* y la opacidad de la cepa de *Tisochrysis lutea* seleccionados por el biorreactor de la invención después del tiempo de trabajo. La cepa seleccionada muestra una mayor resistencia a la fotoinhibición. Esta cepa puede calificarse como una "cepa adaptada" ya que proviene de la adaptación genética (mutaciones puntuales) de la cepa salvaje de *Tisochrysis lutea*.

Las medidas de opacidad (o de sección transversal) muestran que las células de la cepa adaptada son más de seis veces más transparentes que las de la cepa salvaje. La sección eficaz representa la superficie total de las antenas colectoras de luz. Reducir esta superficie equivale a hacer que las microalgas sean más transparentes.

La Figura 5 muestra la producción de biomasa de la cepa salvaje y la producción de biomasa de la cepa adaptada en un sistema de cultivo convencional del tipo *batch* en luz continua con una intensidad de luz de 110 µmol fotones m^{-2} s^{-1}.

La producción de biomasa de la cepa adaptada se duplica en comparación con la producción de biomasa de la cepa salvaje. El biorreactor de la invención tiene, por lo tanto, un gran interés en la producción industrial de biomasa de microalgas.

La biomasa se produce de manera convencional en un fotobiorreactor cilíndrico de vidrio a una intensidad de luz constante y 110 µmol fotones m^{-2} s^{-1}, a una temperatura constante de 28°C y a un pH constante de 8,2, en un tipo de control *batch*.

La invención también se refiere a un uso del biorreactor tal como se define anteriormente para la producción de biomasa de un cultivo celular escogido del grupo que consiste en las clases Chlorophyceae tales como *Chlamydomonas sp.*, *Dunaliella salina* y *Haematococcus pluvialis*, Bacillariophyceae (Diatomophyceae) tales como *Phaeodactylum tricornutum* i *Odontella aurita*, Isochrysidaceae tales como *Isochrysis galbana* y *Tisochrysis lutea*, Trebouxiophyceae tales como *Chlorella vulgaris*, y Cyanophyceae tales como *Arthrospira platensis*.

La invención también se refiere a un procedimiento para seleccionar microorganismos fotosintéticos tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

El procedimiento permite seleccionar cepas de microorganismos fotosintéticos que tienen una mayor resistencia a la fotoinhibición entre una población de microorganismos fotosintéticos (o cultivo celular de microorganismos fotosintéticos).

Las cepas seleccionadas pueden utilizarse para la producción de biomasa. La explotación industrial de microorganismos fotosintéticos seleccionados ofrece buenos rendimientos en la producción. El procedimiento comprende las siguientes etapas:

1. Proporcionar un biorreactor que comprende una fuente de luz, y un tanque dispuesto frente a la fuente de luz destinado a recibir un medio de cultivo que comprende un cultivo celular de microorganismos fotosintéticos, siendo capaz dicha fuente de luz de emitir luz con una intensidad de luz de entrada I_{in} en dirección del tanque,

2. Llenar el tanque con un medio de cultivo;

3. Inocular el medio de cultivo con un cultivo celular compuesto por microorganismos fotosintéticos;

4. Controlar el tanque durante un tiempo de trabajo a una concentración de cultivo celular x_i seleccionada del medio de cultivo;

5. Ajustar la intensidad de la luz de entrada I_{in},, a un valor de consigna que permite inducir estrés celular en al menos algunos de dichos microorganismos fotosintéticos;

6. Mantener la intensidad de la luz de entrada I_{in},, al valor de consigna durante un tiempo inferior o igual a dicho tiempo de trabajo de manera a provocar una degradación celular de al menos una parte de dichos microorganismos fotosintéticos y así seleccionar los microorganismos fotosintéticos que tienen una mayor resistencia a la fotoinhibición; y

7. Recoger los microorganismos fotosintéticos que tienen una mayor resistencia a la fotoinhibición de dicho medio de cultivo tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Se entiende por degradación celular cualquier degradación que tiene como resultado la eliminación de una célula del medio de cultivo. Puede tratarse muy particularmente de la muerte celular. La muerte celular puede ser causada por daños físicos o químicos - se trata de la necrosis celular; la muerte celular puede causar el suicidio celular; esto se denomina apoptosis. Además, puede tratarse de muerte mitótica (detención de la división celular) en la que la célula ya no puede reproducirse y acaba siendo evacuada del biorreactor cuando éste es controlado de forma continua.

La degradación de las células sensibles al estrés celular tiene como consecuencia que la población de células resistentes (o de células que se han vuelto resistentes por mutación genética) aumenta en el medio de cultivo. Así, La recogida en la etapa 7 se lleva a cabo cuando el medio de cultivo comprende un cultivo celular de microorganismos fotosintéticos que consta de más de 75%, preferiblemente más de 90%, incluso más preferiblemente sustancialmente 100% de microorganismos que tienen una mayor resistencia a la fotoinhibición.

Según la invención, la etapa 6 comprende las siguientes subetapas:

6a. Ajustar la luz a una intensidad de luz de entrada I_{in} a un valor de reposo inferior al valor de consigna durante un tiempo inferior a dicho tiempo de trabajo;

6b). Mantener la intensidad de la luz de entrada I_{in} al valor de reposo durante un tiempo inferior a dicho tiempo de trabajo; y

6c). Cambiar sucesivamente entre el valor de reposo y el valor de consigna durante el tiempo de trabajo.

Por supuesto, en esta realización, mantener en la etapa 6 la intensidad de la luz de entrada I_{in}, al valor de consigna tiene lugar durante un tiempo inferior al tiempo de trabajo. Esto es necesario para poder cambiar entre el valor de reposo y el valor de consigna durante todo el tiempo de trabajo.

Según la invención, el procedimiento comprende las siguientes subetapas:

- establecer un primer tiempo de irradiación durante el cual la luz se ajusta a la intensidad de luz de entrada I_{in} al valor de reposo; y

- establecer un segundo tiempo de irradiación durante el cual la luz se ajusta al valor de consigna.

Por motivos de fotoaclimatación, el primer tiempo de irradiación es preferentemente superior que el segundo tiempo de irradiación. Esta realización da como por lo tanto como resultado la sucesión de primeros tiempos de irradiación y segundos tiempos de irradiación. Cada primer tiempo de irradiación durante el cual la luz se ajusta a la intensidad de luz de entrada I_{in} en el valor de reposo, es seguido por un segundo tiempo de irradiación, durante el cual la luz se ajusta a la intensidad de la luz de entrada I_{in} al valor de consigna. Las células de las microalgas se ven así sometidas a una sucesión de fases de estrés y de fases de fotoaclimatación (o fases de reposo). Cabe señalar que la intensidad de la luz de entrada I_{in} al valor de reposo puede corresponder en ausencia de luz, es decir, en la oscuridad; por lo tanto 0 µmol quanta m^{-2} s^{-1}. En otras realizaciones, el valor de reposo puede estar comprendido entre 10 y 200 µmol quanta m^{-2} s^{-1}, por ejemplo 50 µmol quanta m^{-2} s^{-1} o 100 µmol quanta m^{-2} s^{-1}.

Según la invención, los primero y segundo tiempos de irradiación se fijan de modo que el valor medio de la intensidad luminosa de I_{in} el tiempo de trabajo calculado a partir del valor de reposo y el valor de consigna sea inferior o igual a un tercio de dicho valor de consigna. Esto asegura un tiempo de reposo suficiente para que las células se aclimaten a las condiciones de estrés. En una realización particular, el primer tiempo de irradiación es al menos tres veces superior al segundo tiempo de irradiación.

Preferiblemente, el tiempo de trabajo es superior que el tiempo requerido para al menos 20 ciclos celulares, preferiblemente 100 ciclos celulares, de cada célula de microalga inicial presente en el medio de cultivo.

Ventajosamente, el procedimiento implementa una repetición sucesiva de las etapas 5 y 6 hasta que se obtiene un cultivo celular de microorganismos fotosintéticos sustancialmente constituidos de microorganismos que tienen una mayor resistencia a la fotoinhibición. La repetición de estas etapas permite una selección satisfactoria y favorece la fotoaclimatación de las células.

El procedimiento puede comprender además las siguientes etapas:

8. Inocular un medio de cultivo con los microorganismos fotosintéticos recogidos en la etapa 7 en un biorreactor; y

9. Controlar el biorreactor de la etapa 8 para una producción de biomasa que consiste en dichos microorganismos fotosintéticos.

Esta etapa puede llevarse a cabo en el mismo biorreactor o en un biorreactor distinto especialmente adaptado para la producción de biomasa. Por ejemplo, el biorreactor puede ser un tanque de cultivo (tanque de tipo “raceway”) y un sistema de cultivo cerrado como los biorreactores alimentados por *batch*, los biorreactores alimentados por *fed-batch* o los biorreactores alimentados en continuo.

El procedimiento de la invención puede comprender además una subetapa 4a. que comprende la medida de la intensidad luminosa en la salida I_{out}. La intensidad de la luz de entrada I_{in} en la etapa 5. se puede ajustar entonces en función de la intensidad de la luz de salida I_{out} medida en la etapa 4a. En esta realización, el biorreactor comprende un sensor de luz dispuesto frente a dicha fuente de luz con respecto al tanque (el sensor está frente a la fuente de luz). El sensor de luz está dispuesto de manera a medir la intensidad de la luz de salida (I_{out}).

Preferiblemente, el valor de consigna de la intensidad de la luz de entrada I_{in} es superior o igual a 500 µmol quanta m^{-2} s^{-1}. En una realización particular, el valor de consigna es superior o igual a 800 µmol quanta m^{-2} s^{-1}.

En otra realización particular, el valor de consigna aumenta por pasos durante el tiempo de trabajo (por ejemplo en pasos de 200 µmol quanta m^{-2} s^{-1}). Esto aumenta aún más la selección. Esto conduce entonces a una selección más estricta. Al final del tiempo de trabajo, sólo subsisten en el medio de cultivo las microalgas altamente resistentes a la fotoinhibición. Los valores de consignas siguientes pueden ser aplicados en particular de manera sucesiva: 800 µmol quanta m^{-2} s^{-1}; 1000 µmol quanta m^{-2} s^{-1}; 1200 µmol quanta m^{-2} s^{-1}; 1400 µmol quanta m^{-2} s^{-1}; 1600 µmol quanta m^{-2} s^{-1}. Las fases durante las cuales la intensidad de la luz de entrada I_{in} se ajusta a los valores de consignas, opcionalmente pueden ser seguidas por fases durante las cuales la intensidad de la luz de entrada I_{in} se ajusta en a los valores de reposo, por ejemplo, a un valor cercano o igual a 0 µmol quanta m^{-2} s^{-1} (oscuridad) o cerca de 50 a 100 µmol quanta m^{-2} s^{-1}. Esto permite que las microalgas se aclimaten y, llegado el caso, inicien una modificación a nivel molecular (mutaciones genéticas en particular).

Preferentemente, el control en la etapa 4 se lleva a cabo a una concentración (por ejemplo a un valor comprendido entre 0,001 g/l a 10 g/l, preferentemente entre 0,05 g/l a 0,1 g/l o entre 0,1 g/l a 5 g/l).

REIVINDICACIONES

1. Biorreactor caracterizado por que comprende una fuente de luz (200), un sensor de luz (300) frente a dicha fuente de luz y un tanque (100) dispuesto entre la fuente de luz (200) y el sensor de luz (300) destinado a recibir un medio de cultivo que comprende un cultivo celular de microorganismos fotosintéticos, un controlador (400) conectado al sensor de luz (300) para controlar el tanque (100) a una concentración de cultivo celular escogida (x_i) en el medio de cultivo durante un periodo de trabajo, siendo dicha fuente de luz (200) capaz de emitir una luz incidente (L) con una intensidad de luz de entrada (I_{in}) en la dirección del tanque (100), y siendo el sensor de luz (300) capaz de medir una intensidad de luz de salida (I_{out}) y de transmitir datos relativos a esta intensidad (I_{out}) al controlador para el control del tanque, y un control (500) de la fuente de luz (200), dispuesto para regular, durante un tiempo inferior a dicho tiempo de trabajo, la intensidad de la luz de entrada (I_{in}) a un valor de consigna que permite inducir estrés celular en al menos algunos de dichos microorganismos fotosintéticos, y en el que el controlador también está dispuesto para ajustar dicha luz a una intensidad de luz de entrada (I_{in}) a un valor de reposo inferior al valor de consigna, y para cambiar entre el valor de reposo y el valor de consigna durante el período de trabajo, y en el que el sistema también está dispuesto para establecer un primer período de irradiación durante el cual la luz se ajusta a la intensidad de la luz de entrada (I_{in}) al valor de reposo y un segundo tiempo de irradiación durante el cual la luz se ajusta al valor de consigna, siendo el primer tiempo de irradiación mayor que el segundo tiempo de irradiación, y para aplicar una sucesión de los primer y segundo periodos de irradiaciones, y en el que los primero y segundo tiempos de irradiación se fijan de manera que el valor medio de la intensidad de la luz de entrada (I_{in}) durante el período de trabajo, calculada a partir del valor de reposo y el valor de consigna, sea inferior o igual a un tercio de dicho valor de consigna.

2. Biorreactor según la reivindicación 1, en el que el valor de consigna es mayor o igual a 500 µmol quanta m^{-2} s^{-1}, preferiblemente mayor o igual a 800 µmol quanta m^{-2} s^{-1}.

3. Biorreactor según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración de cultivo celular escogida (x_i) en el medio de cultivo está comprendida entre 0,001 g/l y 0,1 g/l, preferentemente entre 0,05 g/l y 0,1 g/l.

4. Biorreactor según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el primer tiempo de irradiación es al menos tres veces mayor que el segundo tiempo de irradiación.

5. Bioreactor según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el control está además configurado para establecer una pluralidad de primero y segundo tiempos de irradiaciones durante los cuales la luz se ajusta en una intensidad de luz de entrada (I_{in}) al valor de reposo durante cada primer tiempo de irradiación y la luz se ajusta a una intensidad de luz de entrada (I_{in}) al valor de consigna durante cada segundo tiempo de irradiación.

6. Biorreactor según la reivindicación 5, en el que el controlado también está dispuesto para establecer el valor de consigna en cada segundo tiempo de irradiación.

7. Biorreactor según una de las reivindicaciones 1 y 2, en el que la concentración de cultivo celular escogida (x_i) en el medio de cultivo está comprendida entre 0,1 g/l y 10 g/l, preferentemente entre 1 g/l y 10 g/l.

8. Bioreactor según la reivindicación 7, en el que el control se puede configurar para mantener la intensidad de la luz de entrada (I_{in}) al valor de consigna para que la intensidad de la luz de salida (I_{out}) es sustancialmente constante durante un tiempo inferior o igual al tiempo de trabajo.

9. Procedimiento para seleccionar microorganismos fotosintéticos, que comprende las siguientes etapas:
1. Proporcionar un biorreactor que comprende una fuente de luz, y un tanque dispuesto frente a la fuente de luz destinado a recibir un medio de cultivo que comprende un cultivo celular de microorganismos fotosintéticos, siendo capaz dicha fuente de luz de emitir luz con una intensidad de luz de entrada I_{in} en dirección del tanque,
2. Llenar el tanque con un medio de cultivo;
3. Inocular el medio de cultivo con un cultivo celular compuesto por microorganismos fotosintéticos;
4. Controlar el tanque durante un tiempo de trabajo a una concentración de cultivo celular x_i seleccionada del medio de cultivo;
5. Ajustar la intensidad de la luz de entrada $I_{in,}$, a un valor de consigna que permite inducir estrés celular en al menos algunos de dichos microorganismos fotosintéticos;
6. Mantener la intensidad de la luz de entrada $I_{in,}$, al valor de consigna durante un tiempo inferior o igual a dicho tiempo de trabajo de manera a provocar una degradación celular de al menos una parte de dichos microorganismos fotosintéticos y así seleccionar los microorganismos fotosintéticos que tienen una mayor resistencia a la fotoinhibición; y
7. Recoger los microorganismos fotosintéticos que tienen mayor resistencia a la fotoinhibición de dicho medio de cultivo.
en el que la etapa 6 comprende las siguientes subetapas:
6a. Ajustar la luz a una intensidad de luz de entrada a un valor de reposo inferior al valor de consigna durante un tiempo inferior a dicho tiempo de trabajo;
6b). Mantener la intensidad de la luz de entrada al valor de reposo durante un tiempo inferior a dicho tiempo de trabajo; y

6c). Cambiar sucesivamente entre el valor de reposo y el valor de consigna durante el tiempo de;
y en el que el procedimiento comprende además las subetapas de:
- establecer un primer tiempo de irradiación durante el cual la luz se ajusta a la intensidad de luz de entrada al valor de reposo; y
- establecer un segundo tiempo de irradiación durante el cual la luz se ajusta al valor de consigna,
estando los primero y segundo tiempos de irradiaciones se ajustan de manera que el valor promedio de la intensidad de luz de I_{in} el tiempo de trabajo calculado a partir del valor de reposo y el valor de consigna sea inferior o igual a un tercio de dicho valor de consigna.

10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la etapa 7 se lleva a cabo cuando el medio de cultivo comprende un cultivo celular de microorganismos fotosintéticos que consta de más de 75%, preferiblemente más de 90%, incluso más preferiblemente sustancialmente 100% de microorganismos que tienen una mayor resistencia a la fotoinhibición.

11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9 y 10, que comprende además las siguientes etapas:
8. Inocular un medio de cultivo con los microorganismos fotosintéticos recogidos en la etapa 7 en un biorreactor; y
9. Controlar el biorreactor de la etapa 8 para una producción de biomasa que consiste en dichos microorganismos fotosintéticos.

12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9 a 10, en el que el biorreactor también comprende un sensor de luz a la opuesta de dicha fuente de luz con respecto al tanque, siendo capaz el sensor de luz de medir una intensidad de luz de salida (I_{out}); comprendiendo además el procedimiento la etapa 4a de medir la intensidad de la luz de salida (I_{out}), y en el que la intensidad de la luz de entrada (I_{in}) en la etapa 5 se ajusta en función de la intensidad de la luz de salida (I_{out}) medida en la etapa 4a.

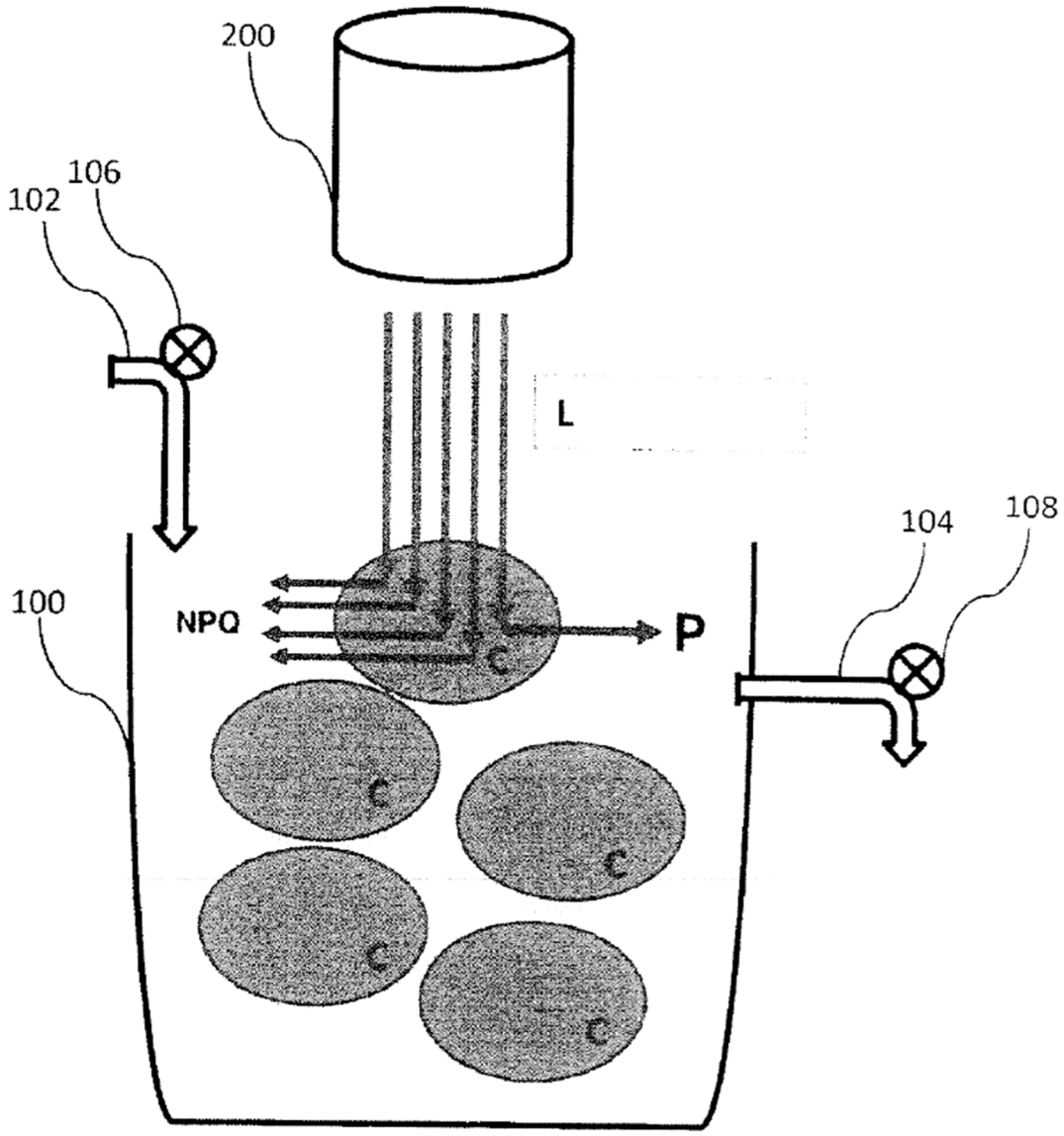

Figura 1

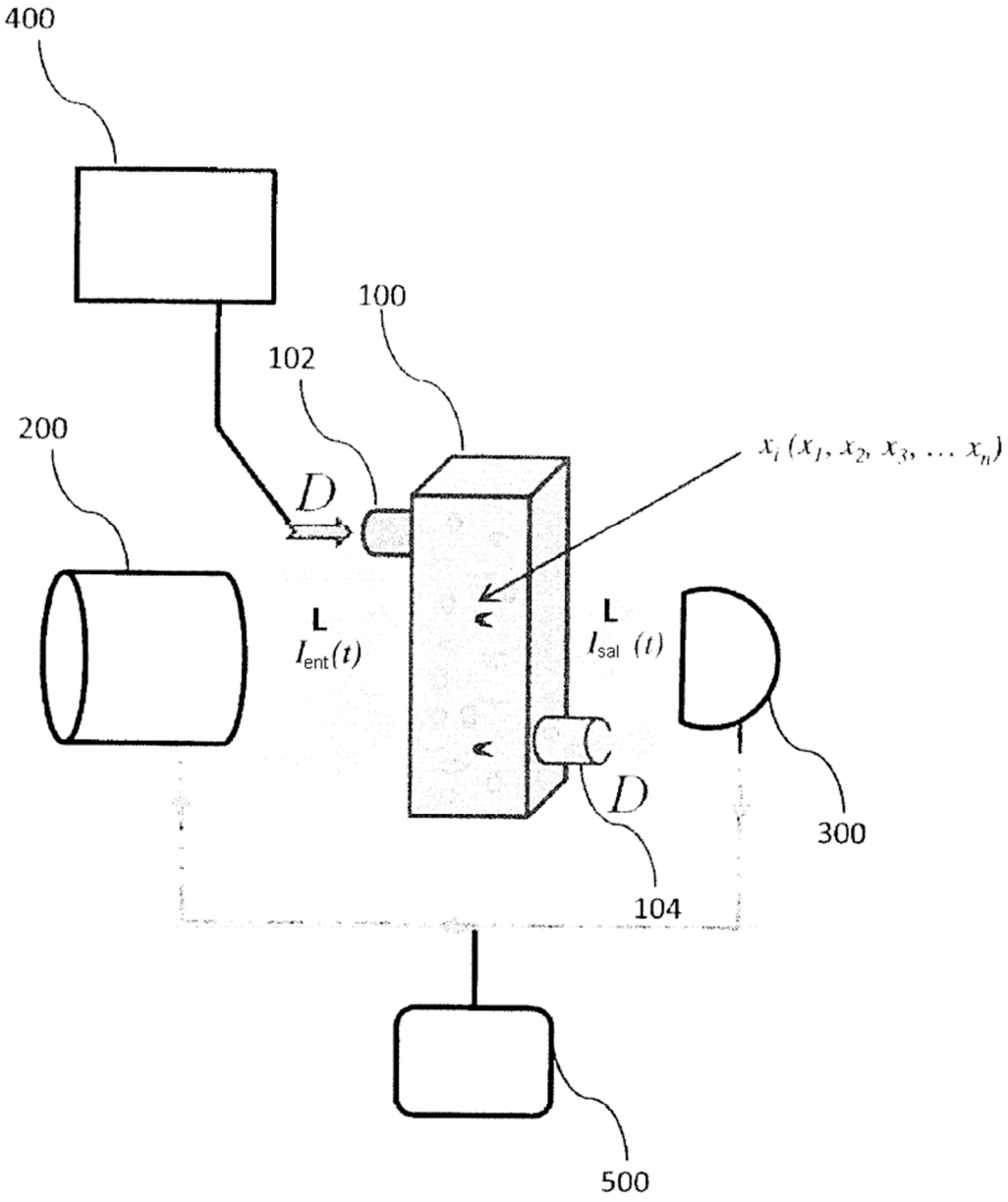
400
100
102
200
$x_i\ (x_1, x_2, x_3, \ldots x_n)$
D
L
$I_{ent}(t)$
L
$I_{sal}\ (t)$
D
300
104
500

Figura 2

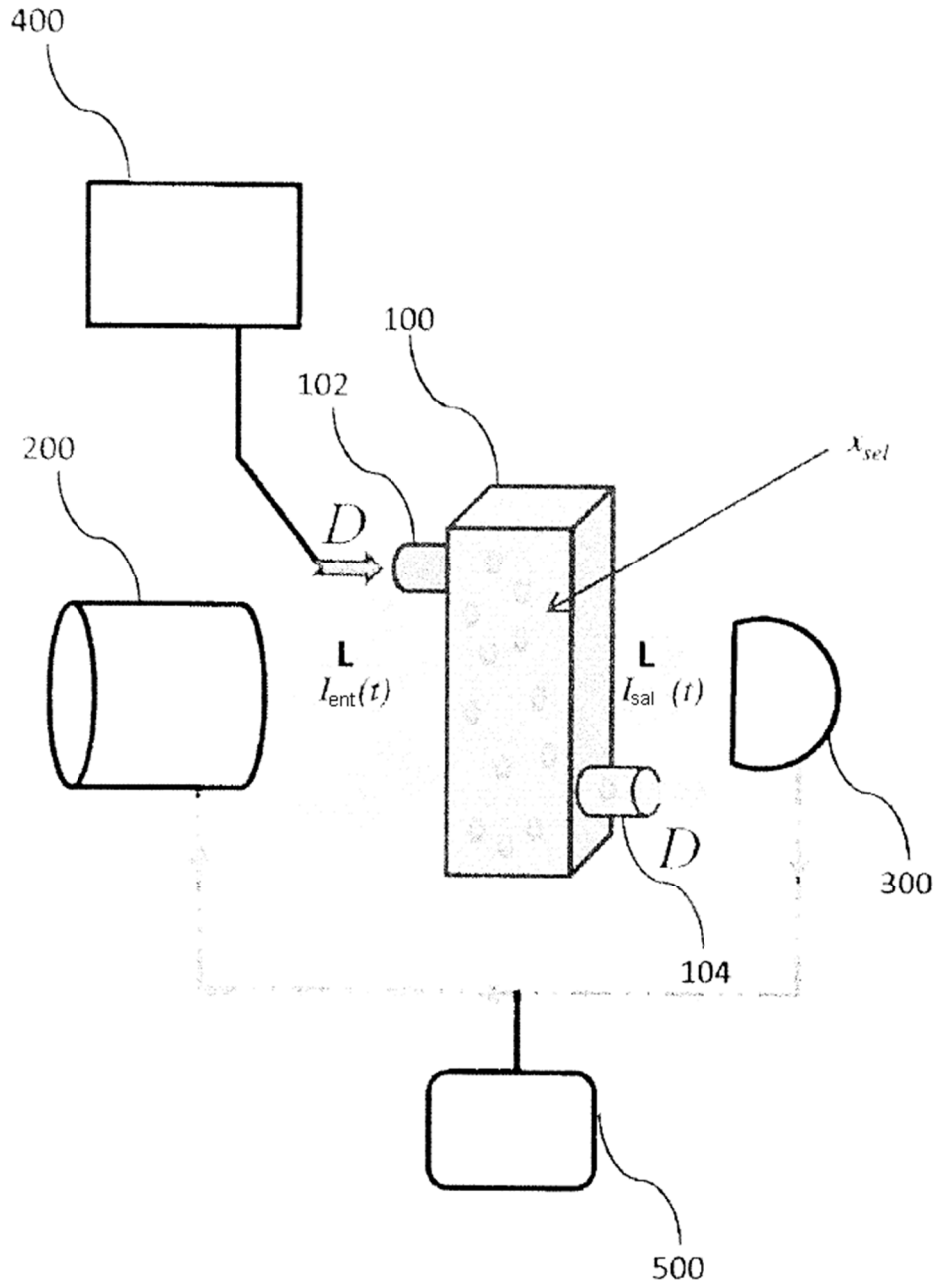

Figura 3

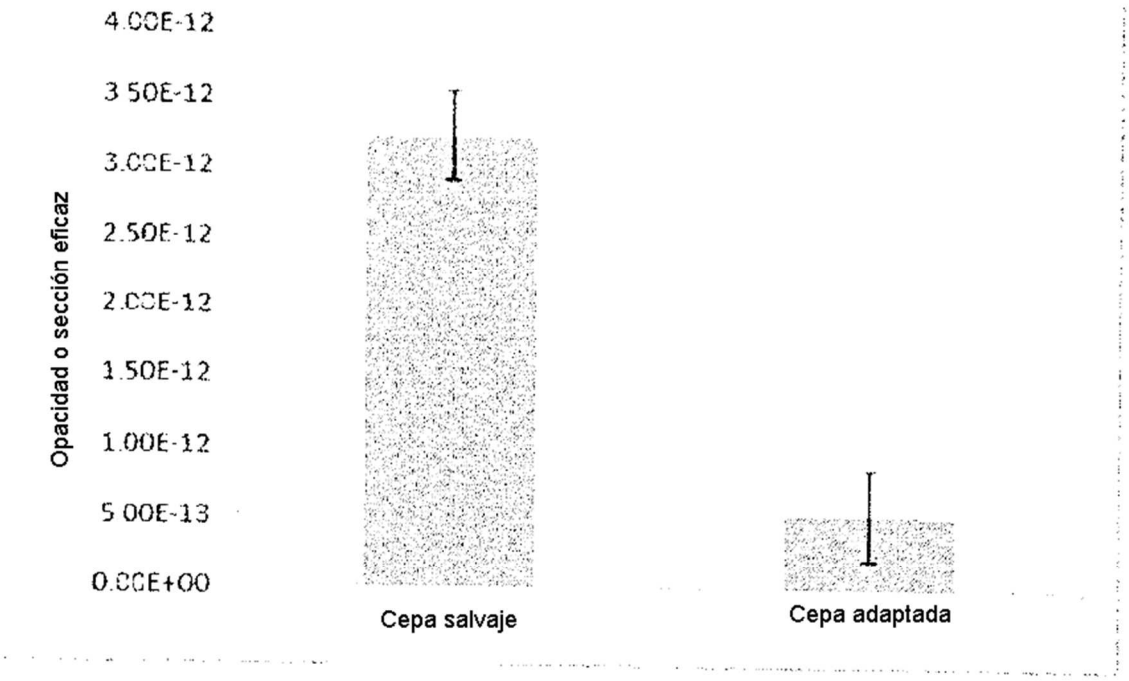

Figura 4

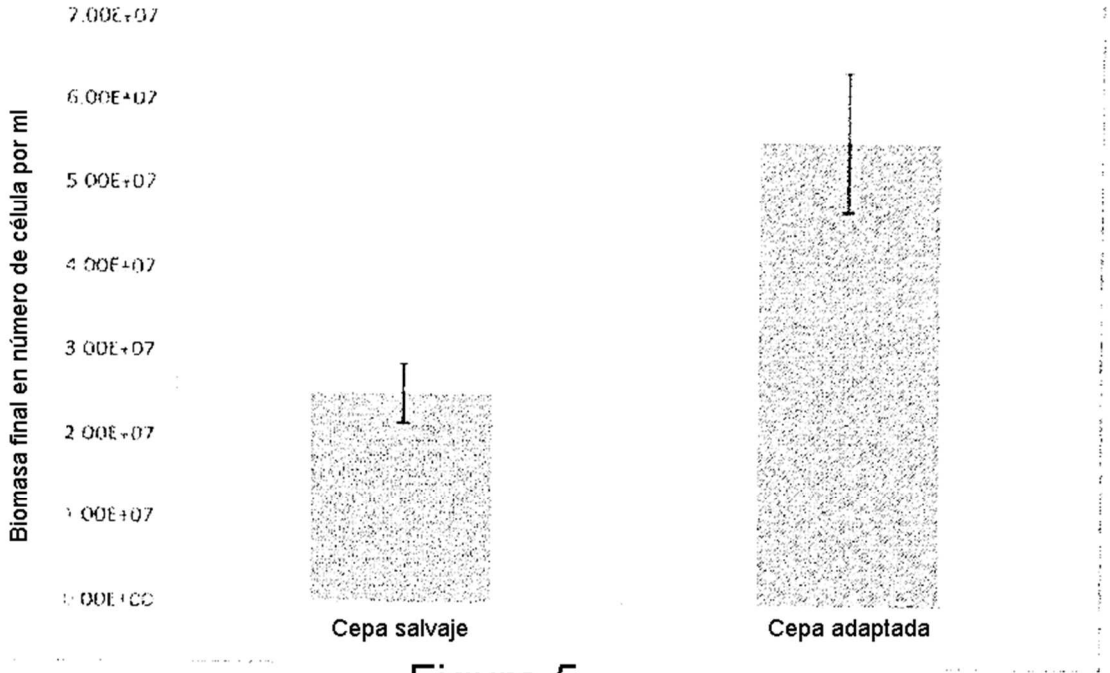

Figura 5