



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 345 258**

51 Int. Cl.:

A61K 36/02 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

C12P 23/00 (2006.01)

C12R 1/89 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05000776 .4**

96 Fecha de presentación : **15.01.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1681060**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.07.2006**

54

Título: **Procedimiento mejorado para obtener caroteno y carotenoides de algas y cianobacterias.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.09.2010

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.09.2010

73

Titular/es: **COGNIS IP MANAGEMENT GmbH**
Henkelstrasse 67
40589 Düsseldorf, DE

72

Inventor/es: **Johannisbauer, Wilhelm;**
Mahnke, Eike Ulf;
Sander, Andreas;
Weiss, Albrecht;
Pulz, Otto y
Franke, Horst

74

Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 345 258 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento mejorado para obtener caroteno y carotenoides de algas y cianobacterias.

5 **Objetivo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento mejorado para obtener carotenos o carotenoides de algas o cianobacterias, especialmente para la fabricación de astaxantina a partir de cepas de *Haematococcus*.

10 **Estado de la técnica**

El cultivo de algas, particularmente *Haematococcus pl.*, para la producción de carotenos y carotenoides, por ejemplo, beta-caroteno o astaxantina, se divide en la llamada "Fase Verde", que se dirige al crecimiento de la masa de algas, y una "Fase Roja", para la producción de los carotenoides en las células. Ambas partes del procedimiento de cultivo tienen que optimizarse para dar tanto carotenoide como sea posible por unidad de tiempo en un volumen de fotobiorreactor dado. Una visión de conjunto se da en: Amos Richmond, "Handbook of micro-algae culture: Biotechnology and Applied Physiology", pp 70-72 (2004), Blackwell Science Ltd, Oxford, donde también se analiza la influencia negativa de altas concentraciones de oxígeno en el cultivo del alga *Spirulina* y se indica una fotoinhibición para la producción.

EP 0877817 B1 (Ben Gurion University) se refiere a un procedimiento para la producción a gran escala de astaxantina a partir de *Haematococcus*. Con más detalle, la patente muestra un procedimiento de cultivo bifásico, la primera fase proporciona el mantenimiento de un crecimiento vegetativo óptimo de las células bajo condiciones ambientales controladas. Este primer estadio o fase se caracteriza porque las células tienen división celular continua y una relación astaxantina/clorofila entre aproximadamente 0,1 y 0,4, y un incremento en el contenido de clorofila durante el procedimiento de cultivo. En la segunda fase de este procedimiento, se alcanzaba la inducción de la producción y la acumulación de astaxantina dentro de las células al recoger las células del cultivo de células verdes anterior y someterlas a estrés mediante privación de nutrientes al resuspender las células en agua corriente enriquecida con CO₂, seguido por el cultivo de las células bajo exposición a altas intensidades lumínicas, p. ej., luz solar completa.

Boussiba describe la carotenogénesis en el alga verde *Haematococcus pluvialis* [Physiol. Plant 108: 111-117 (2000)] y ha estudiado las diversas condiciones de estrés ambiental, como intensidades lumínicas, limitaciones de nitrógeno y fosfato y estrés salino. Sugiere que además de las altas intensidades lumínicas, las especies de oxígeno reactivas, p. ej., radicales oxígeno generados a través de la adición de colorantes fotosensibilizadores a la suspensión de cultivo, median en la inducción de la síntesis de astaxantina.

También se hace referencia a Biotechnology Letters, Vol. 23(7), p. 519-523 (2001). Este documento divulga un procedimiento de acuerdo con el cual la microalga *Chlorococcum sp.* se somete a estrés químico mediante la adición de peróxido de hidrógeno para mejorar la estimulación de la producción de astaxantina. Sin embargo, el sometimiento a estrés tiene lugar durante la llamada "Fase Verde".

Los costes de producción de los carotenos y carotenoides, p. ej. beta-caroteno, licopeno, luteína y especialmente astaxantina, a partir de algas son altos debido a los grandes volúmenes de reactor y las altas intensidades lumínicas para cada célula de alga en la llamada Fase Roja. Habitualmente, la luz no puede penetrar más de aproximadamente 5 cm en fermentaciones de algas de alta densidad. Estas condiciones lumínicas óptimas para la Fase Roja no están disponibles en Europa del norte.

Por lo tanto, el objetivo que subyace a la presente invención ha sido desarrollar un procedimiento para producir carotenoides, particularmente astaxantina, en la Fase Roja con aproximadamente las mismas intensidades lumínicas bajas que en la Fase Verde para producir económicamente carotenoides también bajo las condiciones lumínicas europeas. Por lo tanto, más particularmente, los principales propósitos han sido

- Separación del cultivo en dos etapas principales, de modo que cada etapa pueda llevarse a cabo en reactores separados usando diferentes medios de cultivo,
- Adición controlada de nutrientes que contienen C en la fase de crecimiento (Fase Verde),
- Procedimiento controlado de división celular y agrandamiento celular (Fase Verde),
- Inducción de síntesis de astaxantina bajo las mismas condiciones lumínicas bajas después de la reducción de nutrientes y fertilizantes cuando se cambia a la Fase Roja.

65 **Descripción de la invención**

La presente invención reivindica un procedimiento mejorado para la producción de carotenos o carotenoides a partir de algas o cianobacterias, que comprende

- (a) cultivar algas o cianobacterias que tienen capacidad para la biosíntesis de carotenos o carotenoides bajo condiciones adecuadas para el crecimiento vegetal óptimo de dichas células en la llamada “Fase Verde”, y
- (b) recoger las células así obtenidas y cultivarlas [a temperaturas en el intervalo de 5 a 35°C e intensidades lumínicas de 30 a 200 $\mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ en la llamada “Fase Roja”,

que se caracteriza porque la intensidad lumínica en la etapa (b) no se incrementa en comparación con la etapa (a) y porque las células cultivadas se someten a estrés químico añadiendo una sustancia que libera especies de oxígeno activas para la inducción de la síntesis de carotenos o carotenoides en una etapa o repetidamente a lo largo de todo el período de la Fase Roja.

Para solucionar el problema descrito anteriormente, el solicitante ha llevado a cabo una investigación sistemática para optimizar las condiciones de reacción en las Fases Verde así como en la Roja. La fase de crecimiento se ha establecido como cultivo mixotrófico con la adición controlada de nutrientes como glucosa o acetato sódico además del uso de dióxido de carbono para asegurar un crecimiento celular rápido. Mediante este método, la velocidad de crecimiento o la productividad para la masa de algas se mejoraba en un factor de 5 a 10. Para mejoras adicionales de la fase de crecimiento se ha encontrado ventajoso tener dos estadios con

(i) división celular controlada y

(ii) engrandecimiento de las células pequeñas antes de cambiar a la Fase Roja (producción de carotenoides).

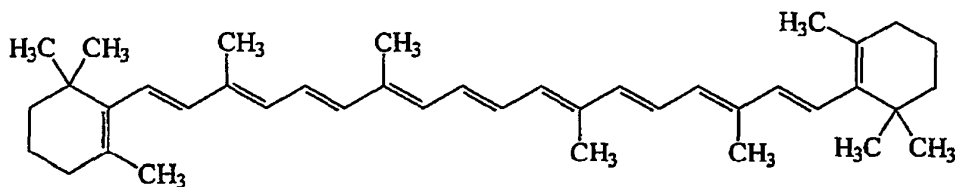
También se han probado diferentes factores de estrés para inducir la formación de carotenoides en la Fase Roja. Las algas se preparan para que sobrevivan, y una teoría generalmente analizada es que los carotenoides se producen para proteger al fotosistema de las algas. Por lo tanto, un enfoque común del estado de la técnica ha sido comenzar la Fase Roja con una intensidad lumínica muy superior en comparación con la Fase Verde.

Sorprendentemente, el solicitante ha encontrado que puede alcanzarse un nivel de producción aún mayor de carotenoides en general, y más particularmente de astaxantina, manteniendo las mismas condiciones lumínicas a lo largo de toda la fermentación (Fases Verde y Roja) si la suspensión de algas se somete a estrés químico añadiendo sustancias que liberan especies de oxígeno activas, particularmente mediante la adición de peróxidos, y más particularmente peróxido de hidrógeno. De acuerdo con el procedimiento de la invención, se alcanza una inducción potenciada de la ruta de carotenoides, que conduce a un nivel superior de enzimas directamente implicadas en el metabolismo. Esto lleva consigo una biosíntesis potenciada de carotenoides en general, y más particularmente de astaxantina.

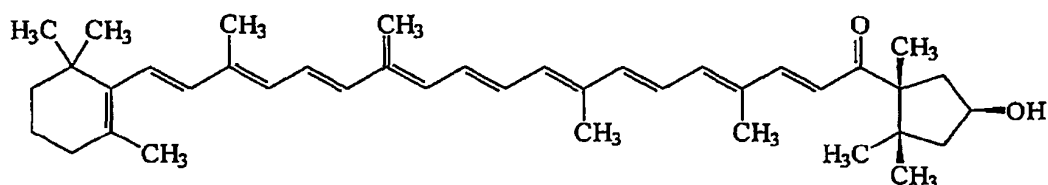
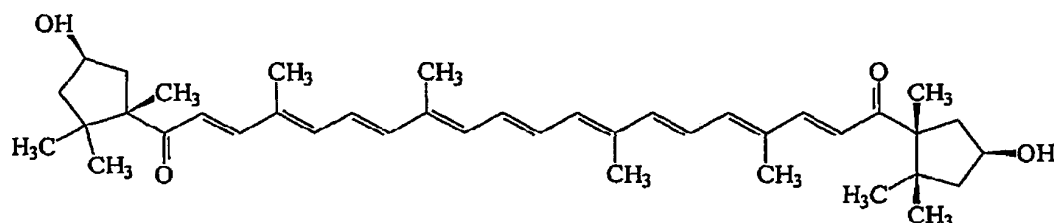
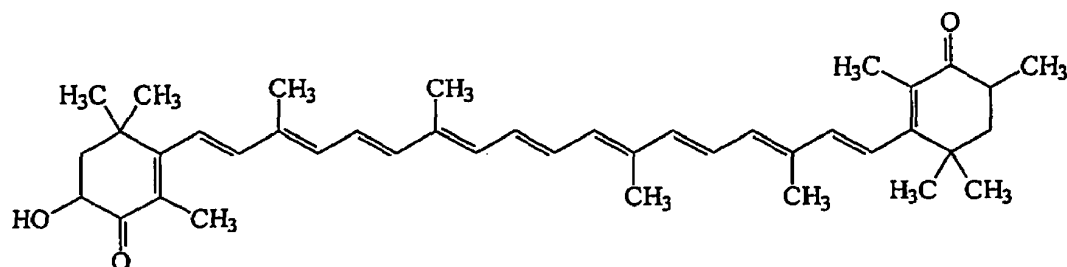
Los mejores resultados alcanzados mediante la adición de peróxido de hidrógeno daban como resultado una reducción económicamente importante del tiempo de cultivo en un factor de 5 a 8 para alcanzar las mismas concentraciones de astaxantina en comparación con una inducción de alta intensidad lumínica con la misma cepa. Por ejemplo, en total, los costes de fabricación de algas que contenían de 3 a 4% en peso de astaxantina podrían reducirse en un factor de 5 a 10 frente al estado de la técnica conocido de la bibliografía.

Carotenos y carotenoides

Los carotenos representan un grupo de tetraterpenos insaturados que tienen de 11 a 12 dobles enlaces. De principal importancia son los tres carotenos isómeros α , β y γ , que muestran todos la misma estructura que comprende 9 dobles enlaces conjugados y un resto de β -ionona en el extremo de la molécula. En lo siguiente, se muestran algunos carotenos que pueden obtenerse a partir de algas:



Beta-caroteno

**Capsantina****Capsorrubina****Astaxantina**

Además de los isómeros ya mencionados, también pueden tenerse en cuenta el δ -, el ε - y el ζ -caroteno (licopeno), aunque el β -caroteno (provitamina A) es de principal importancia, que pueden dividirse en dos moléculas de retinal mediante ciertas enzimas. Los derivados que contienen oxígeno de dichos carotenos se denominan carotenoides o xantófilos. Su estructura general consiste en 8 unidades de isopreno (tetraterpenos). Puede considerarse que los carotenoides están formados por dos isoprenoides C20 que están conectados de modo que los grupos metilo centrales estén en posición 1,6. Ejemplos típicos son (3R,6'R)- β - ε -caroteno-3,3'-diol (luteína), (3R,3'S,5'R)-3,3'-dihidroxi- β , κ -caroten-6-ona (capsantina), éster 6'-metílico de ácido 9'-cis-6,6'-diapocarotenodicarboxílico (bixina), (3S,3'S,5R,5'R)-3,3'-dihidroxi- κ , κ -caroteno-6,6'-diona (capsorrubina) y especialmente (3S,3'S)-3,3'-dihidroxi- β , β '-caroteno-4,4'-diona (astaxantina). Carotenoides adicionales de la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en luteína, licopeno, violaxantina, criptoxantina, anteraxantina, neoxantina, zeaxantina, fitoeno y fitoflueno.

A lo largo de la presente invención, la expresión "carotenos y carotenoides" también cubrirá productos típicos que se obtienen mediante la escisión de los compuestos citados, como, p. ej., 3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexenil)-2,4,6,8-nonatetraen-1-ol (retinol, vitamina A1) y 3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexenil)-2,4,6,8-nonatetraenal (retinal, aldehído de vitamina A1).

Algas

El procedimiento de la presente invención se dirige a algas que tienen capacidad para la biosíntesis de carotenos y carotenoides. Sin limitar la invención, ejemplos típicos son *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella sp.*, *Chlorella fusca*, *Chlorella salina*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella stigmatofora*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella autotrophica*, *Chlorella luteoviridis*, *Chlorella protothecoides*, *Chlorococcum sp.*, *Chlorococcum citrifforme*, *Cyanidium caldarium*, *Euglena sp.*, *Euglena gracilis*, *Monoraphidium braunii*, *Muriellopsis sp.*, *Nannochloropsis gaditana*, *Nannochloris sp.*, *Nannochloris maculata*, *Nannochloris oculata*, *Nannochloropsis salina*, *Navicula pelliculosa*, *Neosporangiococcum gelatinosum*, *Scenedesmus vacuolatus*, *Porphyridium purpureum*, *Dunaliella sp.*, *Dunaliella tericiolecta*, *Micromonas pusilla*, *Neosporangiococcum excentricum*, *Porphyridium cruentum*, *Pynococcus provasolli*, *Scenedesmus armatus*, *Scenedesmus obliquus*, *Scenedesmus quadricauda*, *Anacystis nidulans*, *Oscillatoria nubescens*, *Aphanocapsa sp.*, *Gymnodinium sp.*, *Microcystis aeruginosa*, *Athrospira sp.*, *Phormidium laminosum*, *Phormidium persicium*, *Phormidium luridum* y *Phormidium faveolarum*.

Ejemplos preferidos son *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*, *Haematococcus lacustris*, *Murielopsis sp-haerica* y *Chlorella zofingiensis*.

Dunaliella y *Haematococcus*, p. ej., representan ejemplos típicos de microalgas verdes que bajo ciertas condiciones ambientales son capaces de acumular una gran cantidad de carotenos o carotenoides, como beta-caroteno o astaxantina. La microalga *Haematococcus* muestra un ciclo vital único, que comprende varios estadios que comprenden flagelados, palmeloides, quistes, cigotos, flagelados rojos y gametos, pero en principio también pueden distinguirse dos estadios para *Dunaliella* y *Haematococcus*: un estadio vegetativo móvil verde en el que las células se dividen continuamente y sintetizan clorofila, y un estadio de reposo inmóvil rojo (quiste) en el que la división celular se detiene, el contenido de clorofila permanece constante y el contenido de carotenos/carotenoides y el peso celular seco se incrementan continuamente. Las condiciones ambientales y nutricionales óptimas requeridas para estos dos estadios son bastante diferentes. Para el crecimiento vegetativo, son esenciales un medio lleno de nutrientes, una intensidad lumínica moderada y una temperatura y un valor de pH adecuados. Sin embargo, para el estadio de reposo, no se requiere nutriente (excepto carbono) y - habitualmente - es necesaria una intensidad lumínica superior (p. ej., luz solar) para una acumulación de principio activo más rápida. Debido a tal discrepancia, los dos estadios se separan habitualmente en diferentes sistemas de cultivo con un medio diferente de acuerdo con esto. Las estrategias de crecimiento para cada estadio también son diferentes. En la Fase Verde, las condiciones óptimas para la división celular se mantienen para alcanzar el máximo número de células.

En la Fase Roja, las condiciones inductoras óptimas deben proveerse para la acumulación de carotenos/carotenoides. Una realización preferida de la presente invención es obtener astaxantina a partir de cepas de *Haematococcus*. Para los propósitos del procedimiento de la invención, puede emplearse cualquier número de cepas de *Haematococcus*, por ejemplo, cepas tales como las mostradas en la Tabla I posteriormente.

TABLA I

Cepas de <i>Haematococcus</i>	
Cepas y Especies de <i>Haematococcus</i>	Fuente
<i>H. pluvialis</i> flotow CCAG	CCAG, Göttingen (Alemania)
<i>H. pluvialis</i> flotow NIES	NIES, Tsukaba, Japón
<i>H. pluvialis</i> flotow ETTL 1958/3	ETTL, República Checa
<i>H. pluvialis</i> flotow TAKAOOVA 1983/1	ETIL, República Checa
<i>H. pluvialis</i> flotow 1844 em. Willie K-0084	SCCAP, Dinamarca
<i>H. lacustris</i> UTEX 16	CCAT, EE. UU. de A.
<i>H. lacustris</i> ATCC 30453	ATCC, Maryland (EE. UU. de A.)
<i>H. lacustris</i> CCAP 34/8	CCAP, Escocia
<i>H. lacustris</i> NIES 144	NIES, Tsukaba, Japón
<i>H. lacustris</i> 192.80	CCAG, Göttingen, Alemania
<i>H. lacustris</i> SAG 34-1b	CCAG, Göttingen, Alemania
<i>H. Droeckensis</i> CCAP 43/G	CCAP, Gran Bretaña
<i>H. Cognis</i> 2004	Cognis GmbH

Las cepas anteriores están bien documentadas en la técnica. La cepa preferida de acuerdo con la invención es la cepa ejemplificada posteriormente en la presente memoria, *H. pluvialis* Flo. (K-0084), que tiene entre sus características una tendencia muy baja a aglutinarse, haciéndola particularmente útil para cultivos a gran escala. Debe entenderse que cualquier otra cepa de *Haematococcus* que pueda someterse eficazmente a los procedimientos de acuerdo con la invención también podría emplearse de acuerdo con la invención.

Condiciones generales para la recolección de células de alga

Se conocen muchas condiciones de cultivo y medios de cultivo para cultivos de reserva a pequeña escala y cultivos a gran escala de células de alga. Sin embargo, para los propósitos de la presente invención, se ha encontrado que las condiciones y los medios de cultivo óptimos son realmente las condiciones y los medios relativamente simples descritos en la presente memoria posteriormente, siendo estos por lo tanto los preferidos de acuerdo con la invención.

ES 2 345 258 T3

La intensidad lumínica en las Fases tanto Verde como Roja podría estar en cualquier parte en el intervalo de aproximadamente 30 a 200, preferiblemente de 50 a 150 y más preferiblemente de 80 a 120 $\mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$.

Se ha encontrado que las células pueden cultivarse tanto en la Fase Verde como en la Roja a una temperatura en el intervalo de 5 a 35, más particularmente entre 18 y 28°C. El límite superior para la temperatura en la Fase Roja podría de hecho alcanzar 35°C, mientras que el límite inferior en este estadio podría ser tan bajo como 5°C. Los mejores resultados se obtuvieron cuando el límite superior se mantenía por debajo de 32°C, y el límite inferior a 15°C.

En una realización preferida adicional de la invención, las algas se hacen crecer mixotróficamente (con nutrientes adicionales para potenciar el crecimiento celular), más particularmente las algas se hacen crecer mixotróficamente en la Fase Verde. Más preferiblemente, las algas se hacen crecer mixotróficamente en la Fase Verde y el estrés tiene lugar preferiblemente en ausencia de los nutrientes de la Fase Verde mixotrófica.

Factores de estrés químico

En contraste con el prejuicio de que las altas concentraciones de oxígeno en el cultivo de algas tienen una influencia negativa y puede provocar fotoinhibición para la producción de principios activos, se ha encontrado sorprendentemente que los factores de estrés químico, preferiblemente las sustancias que liberan especies de oxígeno activas como oxígeno singlete, radical oxígeno o peroxi-compuestos, y más preferiblemente peróxido de hidrógeno, estimulan la producción de carotenos y carotenoides en algas. De hecho, se ha encontrado que el sometimiento a estrés químico de las células es más eficaz en comparación con otros factores de estrés, p. ej., la potenciación de la intensidad lumínica o la privación de nutrientes (aunque la potenciación adicional de la intensidad lumínica no es una desventaja, pero el incremento añadido de la productividad habitualmente es compensado en exceso por los factores económicos). Habitualmente, dichos factores de estrés químico se añaden en una cantidad de 0,05 a 5, preferiblemente de 0,1 a 1 mmol por litro de suspensión de cultivo.

Preferiblemente, estos factores de estrés se añaden a las células cultivadas después de que la Fase Verde haya acabado. Más particularmente, el sometimiento a estrés de la célula cultivada puede tener lugar en una etapa o repetidamente a lo largo de todo el período de la Fase Roja. Aunque la biosíntesis no se ha aclarado con detalle, parece que la adición de factores de estrés químico induce enzimas de la ruta biosintética de los carotenoides que son responsables de la producción de antioxidantes para proteger las células vegetales.

Se observó que bajo las condiciones de estrés y crecimiento anteriores, la velocidad de producción de células de alga, en particular células de *Haematococcus*, era aproximadamente de 0,35 a 0,5 g/l d, y las células contenían aproximadamente de 3 a 4% en peso de carotenos o carotenoides, particularmente astaxantina. Habitualmente, el procedimiento de cultivo en Fase Roja se realizó durante aproximadamente de cuatro a seis días antes de la recolección y el secado de las células. La anterior productividad de carotenos o carotenoides, particularmente de astaxantina, no se ha conseguido en ningún procedimiento a gran escala descrito previamente, ya que proporciona un número de ventajas sobre los procedimientos descritos previamente: es altamente eficaz para el incremento de la biomasa de células de alga así como para la inducción y la acumulación de carotenos y carotenoides en estas células. El fin más interesante para la producción económica de estos principios activos es la productividad, que significa masa producida de carotenos o carotenoides por volumen del reactor y tiempo. Esta cifra tiene la mayor influencia sobre los costes de producción y sobre el éxito en el mercado si este procedimiento se compara con otros procedimientos, p. ej., para la producción de astaxantina, como síntesis química o la producción por la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* (previamente conocida como *Phaffia rhodozyma*).

Procedimiento y condiciones de cultivo detallados

Aunque se han descrito muchos aparatos, sistemas y condiciones para el crecimiento de células de alga, ninguno de estos podría dirigirse a la optimización de las dos fases de crecimiento celular simplemente, eficazmente y económicamente. De acuerdo con esto, el sistema, el aparato y las condiciones preferidos de la presente invención son los ejemplificados en la presente memoria posteriormente.

Fase Verde

En una realización preferida de la presente invención, las cepas de alga se hacen crecer en un medio de crecimiento BG-11 modificado que contiene:

- (i) 0,32 g/l de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$;
- (ii) 0,2 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; y
- (iii) 0,1 g/l de Na_2CO_3 ,

además de los otros constituyentes minerales contenidos en el medio de crecimiento BG-11 estándar.

Se ha mostrado actualmente que la anterior adición de fosfato, magnesio y carbonato proporciona condiciones óptimas para el crecimiento en el estadio verde de las células. El medio BG-11 no modificado no puede soportar cultivos a largo plazo o cultivos densos debido a tener menos de estos aditivos, entrando a menudo tales cultivos en BG-11 no modificado en la Fase Roja de crecimiento antes de lo deseado, es decir, antes de que se haya obtenido la cantidad óptima de células “verdes”. El medio basal se mezcla habitualmente con el medio BG-11 modificado para el crecimiento óptimo de la cepa de alga en el estadio inicial de solamente hacer crecer las células sobre placas de agar o superficies inclinadas. El medio basal usado era el medio basal estándar que es descrito por Kobayashi *et al.* (1991).

El procedimiento de crecimiento en Fase I tiene las siguientes etapas:

- (a) Cultivo de cepas de alga sobre superficies inclinadas o placas de agar sólido: Una cepa axénica se hace crecer y se mantiene en superficies inclinadas o placas de agar sólido que contienen una mezcla de medio BG-11 modificado y medio basal (1:1 v/v) bajo condiciones de intensidad lumínica que varían entre 30 y 40 $\mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 20°C.
- (b) Cultivo de cultivos de reserva líquidos de las algas: Cepas de alga procedentes de las placas o las superficies inclinadas de agar de (a) anteriores se inoculan en 100 ml de medio líquido (siendo el medio BG-11 modificado como en (a)) en matraces de cultivo de 250 ml y subsiguientemente en matraces mayores (o incluso columnas de vidrio) de entre 500 ml y 2,5 l de volumen. Los matraces se incuban en una incubadora giratoria estándar que tiene una fuente de luz controlable bajo condiciones de intensidad lumínica que varían entre 50 y 70 $\mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 23°C (o, cuando se usaban columnas de vidrio, la agitación era por medio de aireación con una mezcla de aire que contenía 1,5% v/v de CO_2). Los cultivos de algas obtenidos en estos cultivos de reserva líquidos son cultivos del llamado tipo de “cultivo verde”, estando las células de alga en la Fase Verde de crecimiento apuntada anteriormente.

Fotobiorreactor

En una realización preferida adicional de la presente invención, las células se cultivan en un fotobiorreactor, preferiblemente un fotobiorreactor tubular o de panel, que tiene la ventaja de una superficie específica muy grande con respecto a su volumen para la producción óptima a gran escala de células de alga en la Fase Verde de crecimiento. Habitualmente, tales biorreactores tienen un volumen en el intervalo de 100 a 35.000 litros, dependiendo de la escala de producción que se desee, y contienen como componentes integrales tubos de PVC, material acrílico (Plexiglas), policarbonato o vidrio disponibles comercialmente que tienen un diámetro de aproximadamente 3 a 5 cm. Durante el funcionamiento, las células del cultivo en agua corriente, a la que se añade CO_2 , se hacen circular a través del dispositivo usando una bomba. Los cultivos verdes procedentes de los cultivos de reserva líquidos (o inóculos) se inoculan en dicho fotobiorreactor, en el que las algas se rocían con una mezcla de CO_2 al 1,5% en aire. La rociadura y el bombeo también sirven para evitar la aglomeración de las células. Debe mencionarse que en una realización especial el procedimiento puede llevarse a cabo en un fotobiorreactor sin recoger la masa de algas entre las Fases Verde y Roja.

La concentración inicial de células en el fotobiorreactor se ajusta preferiblemente hasta entre aproximadamente 0,1 y 0,3 $\times 10^6$ células/ml a concentraciones de células (masa seca) durante el cultivo del procedimiento de entre 0,1-8 g de biomasa seca/l, mediante dilución con medio BG-11 modificado reciente. La intensidad lumínica se mantiene habitualmente en el intervalo de entre 70 y 90 $\mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, que se proporciona mediante lámparas fluorescentes frías blancas estándar que tienen una potencia nominal de 40 vatios. Se ha encontrado ventajoso mantener la temperatura en el fotobiorreactor en el intervalo entre 22-25°C. Bajo estas condiciones de cultivo, puede obtenerse una velocidad de producción de células de alga, especialmente de células de *Haematococcus*, en el intervalo de al menos 0,7 g de células/l de cultivo/día.

Usando un invernadero como una cámara de cultivo interno es fácil mantener temperaturas por debajo de 32°C en Europa central o del norte en verano. Además, el fotobiorreactor tubular y el emplazamiento en interiores tienen la ventaja de una operación limpia, a largo plazo y controlada, y, si el fotobiorreactor está hecho de tubos de vidrio en lugar de plástico, no requiere un mantenimiento o una revisión costosos para funcionar durante mucho tiempo. Además, las condiciones de cultivo son extremadamente económicas, haciéndose crecer las células en agua corriente con la adición de dióxido de carbono como, esencialmente, la principal fuente de nutrientes.

Fase Roja

En otra realización preferida del procedimiento de la invención, las células obtenidas del procedimiento de cultivo en Fase Verde se usan como inóculos para el fotobiorreactor. Las células verdes se inoculan en forma de una suspensión de células verdes en agua corriente, resuspendiéndose habitualmente las células verdes obtenidas del cultivo en Fase Verde en agua corriente en una dilución de aproximadamente 1:3, dando como resultado concentraciones de biomasa de 0,5 a 5 g/l de materia seca. Se añade CO_2 a la suspensión de las células verdes en el biorreactor mediante la inyección de una premezcla con aire. La temperatura en el biorreactor se mantiene ventajosamente a temperaturas por debajo de 32°C.

Sin embargo, debe apuntarse que, en un número de experimentos, se encontró que las células procedentes del estadio de crecimiento verde podían recogerse, concentrarse mediante sedimentación natural debido a su tendencia a

sedimentar, y almacenarse en una cámara fría (aproximadamente 5°C) durante hasta aproximadamente 2 a 3 semanas, antes de su inoculación en el fotobiorreactor de la Fase Roja de crecimiento. Las células recogidas y almacenadas de este modo también pueden empobrecerse en su medio nutritivo inicial, lo que también sirve para inducir estrés en las células y, de ahí, la producción de carotenos o carotenoides según se muestra en EP 0877817 B1.

Se observó que bajo las condiciones de crecimiento en Fase II anteriores, la velocidad de producción de células de alga era aproximadamente 0,4 g/l x d, y que las células de alga contenían aproximadamente 4% en peso de caroteno o carotenoide. Habitualmente, el procedimiento de cultivo en Fase Roja se realiza durante aproximadamente de cuatro a seis días antes de la recolección y el secado de las células que son ricas en caroteno o carotenoide. En caso de que el cultivo tenga lugar en exteriores, en tales cultivos, especialmente los que crecen en los meses de verano cuando las temperaturas ambientales pueden alcanzar, en algunos lugares, tantos grados como de 40 a 45°C, es crucial el control de la temperatura. Según se apunta anteriormente, es necesario mantener la temperatura en el biorreactor por debajo de 32°C para el cultivo óptimo de las células de alga, habiéndose conseguido esto mediante el uso de una aspersión de agua, por lo que agua fría se asperjaba directamente sobre el biorreactor para mantener su temperatura por debajo de 32°C.

Además, en la Fase Roja de crecimiento, las células de alga requieren solamente carbono como la principal fuente de nutrientes, habiéndose suministrado este, según se apunta anteriormente, mediante inyección de CO₂. Esta inyección de CO₂ puede realizarse durante el día y durante la noche. Sin embargo, el CO₂ es esencial sólo durante el día y así puede conseguirse un ahorro adicional de CO₂ interrumpiendo la inyección durante la noche.

Purificación

Para obtener un producto enriquecido en carotenos o carotenoides a partir de las células de alga “rojas” inducidas, se han descrito muchos procedimientos, por ejemplo, los procedimientos de WO 89/006910. Aunque estos procedimientos pueden emplearse de acuerdo con la presente invención, el procedimiento preferido es el de centrifugación o filtración bajo vacío para concentrar las células y secado de las células concentradas. A continuación, la masa de células secada se almacena preferiblemente a bajas temperaturas (p. ej., -20°C o incluso inferiores) bajo condiciones libres de oxígeno, p. ej., mediante envasado a vacío, o, preferiblemente, mediante introducción en bolsas de plástico o similares junto con nitrógeno (N₂) para eliminar el oxígeno.

En otra realización preferida de la invención, el procedimiento comprende las siguientes etapas adicionales:

- (c) Recolectar las células cultivadas en la etapa (b) recogiendo dichas células para formar una suspensión concentrada,
- (d) Añadir antioxidantes y emulsionantes a dicha suspensión, rompiendo las células recogidas y secándolas para obtener un producto enriquecido en carotenos o carotenoides.

Generalmente, la recogida y la concentración de dichas células se lleva a cabo mediante centrifugación o filtración bajo vacío, y en donde el secado de dichas células se realiza mediante liofilización, secado y trituración combinados (molino de torbellino de aire) o secado por aspersión.

Más particularmente, después de la Fase Roja, siendo cada ciclo de cultivo óptimamente de aproximadamente cuatro a seis días, se realiza el siguiente procedimiento de recolección basándose en el hecho de que las células de alga, especialmente las células rojas, sedimentan fácilmente una vez recogidas del fotobiorreactor. Así, la biomasa de células rojas procedente del fotobiorreactor se recoge en un embudo de gran volumen estándar, p. ej. un embudo de Imhoff, y se deja reposar durante unas pocas horas (aproximadamente 3-5 horas) para facilitar la sedimentación de las células rojas. Se encontró que aproximadamente 30% en peso del volumen total de biomasa procedente del biorreactor representaba el sedimento de células rojas, mientras que el restante aproximadamente 70% en peso del volumen total recogido representaba el agua corriente usada en el cultivo en Fase Roja. Esta agua corriente puede así recogerse fácilmente y usarse para una nueva inoculación al biorreactor y un procedimiento de cultivo en Fase Roja (es decir, el agua corriente originalmente usada es casi completamente reciclable). El cultivo de células rojas precipitadas y concentradas anterior se recoge a continuación del embudo y se somete a centrifugación o filtración a vacío para concentrar adicionalmente las células rojas. Normalmente, se obtiene un rendimiento de biomasa de aproximadamente 40% en peso de sólidos (pasta de células rojas) después de la etapa de centrifugación, o aproximadamente 30% en peso de sólidos después de la filtración a vacío. Aquí, además, el aproximadamente 60% en peso del volumen total sometido a centrifugación, o aproximadamente el 70% en peso del volumen total sometido a filtración a vacío, que es el volumen de sobrenadante, también podría recogerse y usarse para otra ronda del procedimiento de cultivo en Fase Roja, siendo este sobrenadante principalmente el agua corriente original usada en el procedimiento en Fase Roja.

A continuación, la lechada de células rojas concentrada obtenida de la etapa de centrifugación anterior se homogeneiza y se estabiliza añadiendo antioxidantes y a continuación se seca, preferiblemente mediante liofilización, aunque el secado por aspersión también resultó ser eficaz. Tales antioxidantes se seleccionan del grupo que consiste en etoxiquina, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado (BHT), tocoferoles, di-terc-butil-paracresol y galato de propilo. Sin embargo, el antioxidante preferido es un producto de tocoferol natural que contiene 30% en peso de alfa-tocoferol para tener al menos un producto natural real. Habitualmente, la cantidad de antioxidante añadida en el procedimiento

de trituración variará de aproximadamente 0,05 a 5% (p/p) de la cantidad de polvo seco. Los polvos se envasan en una bolsa de plástico precargada con nitrógeno gaseoso para eliminar el oxígeno (que provoca la oxidación del pigmento, es decir la degradación del principio activo) y se almacenan a continuación a -20°C antes, p. ej., del procesamiento para preparar el aditivo alimentario para la coloración de peces.

El estadio final para producir un producto enriquecido en carotenos o carotenoides en forma de pequeñas partículas fácilmente digeridas por los peces también puede llevarse a cabo de un número de modos como los descritos previamente en la técnica. El procedimiento preferido es el ejemplificado en la presente memoria posteriormente, que implica el uso de un molino de bolas estándar en el que la lechada de biomasa se desintegra como una suspensión en agua en presencia de cualquier antioxidante adecuado para evitar la oxidación del producto enriquecido en astaxantina. Después de secar, esto da un producto pulverulento de pequeño tamaño de partícula, particularmente útil como un aditivo para comidas para peces, digiriéndose fácilmente estas partículas pequeñas ricas en astaxantina.

El polvo que se obtiene el procedimiento anterior puede utilizarse a continuación directamente o mezclado con otros ingredientes como un aditivo para una comida para peces para obtener coloración o en aplicaciones alimentarias como suplementos dietéticos. En otro procedimiento, los carotenos o carotenoides pueden concentrarse mediante un procedimiento de extracción para usarlos para la formulación de productos de suplemento alimentario o farmacéuticos.

Ejemplos

Selección de cepas de Haematococcus

De la gran variedad de cepas de *Haematococcus*, se usaron las siguientes:

- ATCC 30453, American Type Culture Collection, Rockville, Maryland (Sinónimo *Haematococcus lacustris*)
- CCAP 34/8, Culture Collection of Algae and Protozoa, Escocia
- Nies 144, Culture Collection Japan
- 192.80, Culture Collection, Göttingen, (Sinónimo *Haematococcus lacustris*)
- SAG 34-1b, Culture Collection, Göttingen.

Además, se usó una nueva cepa de *Haematococcus* resultante de la mutagénesis y la clasificación celular, llamada *Cognis2004*. El procedimiento para cultivar las cepas productoras de astaxantina de *Haematococcus* de acuerdo con la presente invención consiste en dos fases, verde y roja, según se describe posteriormente.

Cultivo en Fase Verde de cepas de Haematococcus

Para el cultivo en Fase Verde, se usó un “Medio OHM-N-BG 11 modificado” que contenía:

- (i) 0,32 g/l de $K_2HPO_4 \times 3H_2O$
- (ii) 0,2 g/l de $MgSO_4 \times 7H_2O$ y
- (iii) 0,1 g/l de Na_2CO_3 ,

además de otros constituyentes minerales contenidos en el medio de crecimiento OHM estándar como, por ejemplo, se describe en US 6.022.701, que se incorpora en la presente memoria mediante referencia.

Se realizó el cultivo de cultivos de reserva líquidos de células de *Haematococcus* en 100 ml de medio líquido, como en matraces de cultivo de 250 ml y subsiguientemente en matraces mayores de entre 500 ml-2,0 l de volumen. Los matraces se incubaron en una incubadora giratoria estándar que tenía una fuente de luz controlable bajo condiciones de intensidad lumínica que varían entre 30-60 $\mu E/m^2/s$ a 25°C. Los cultivos de *Haematococcus* obtenidos en estos cultivos de reserva líquidos son cultivos del llamado tipo de “cultivo verde”, que significa planosporas y una gran cantidad de células pequeñas.

Ejemplo 1

Producción de cultivos a gran escala de Haematococcus en un fotobiorreactor tubular

I. El procedimiento de cultivo en Fase Verde

Los cultivos verdes procedentes de los cultivos de reserva líquidos anteriores se inocularon en un fotobiorreactor, en el que las algas se rocían con una mezcla de CO₂ al 1,5% en aire bombeada a través de la parte fotorreceptora tubular del biorreactor. El bombeo y la rociadura también sirven para evitar la aglomeración de las células. El fotobiorreactor usado para estos cultivos a gran escala era uno de tipo tubular de vidrio desarrollado por IGV Potsdam. En este fotobiorreactor, la concentración inicial de células de *Haematococcus* se ajustó hasta entre aproximadamente 0,1 y 0,5 g/l, mediante dilución con medio BG-11 modificado reciente. La intensidad lumínica se mantuvo en el intervalo de entre 120-180 $\mu\text{E} \times \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, que se proporcionaba mediante lámparas fluorescentes frías blancas estándar que tienen una potencia nominal de 40 vatios. La temperatura en el fotobiorreactor se mantuvo en el intervalo de 25°C. Bajo estas condiciones de cultivo, era posible obtener una velocidad de producción de células de *Haematococcus* en el intervalo entre 0,2-1,0 g/l día. Habitualmente, el procedimiento de cultivo en Fase Verde se realizó como una fermentación en lotes repetidos con recolección parcial de células verdes cada dos días de cultivo.

II. El procedimiento de cultivo en Fase Roja

El dispositivo de cultivo usado era un fotobiorreactor tubular estándar disponible con volúmenes que varían de 30 a 35.000 litros. Durante la operación, el cultivo (células de *Haematococcus* en agua corriente, a las que se añade CO₂) se hace circular a través del dispositivo usando una bomba. Para el cultivo de las células de *Haematococcus* en su "estadio rojo" de crecimiento, las células verdes se usaron como inóculos para el fotobiorreactor tubular anterior. El fotobiorreactor tubular se puso en un invernadero. Las células verdes se inocularon en la forma de una suspensión de células verdes en agua corriente, y las células verdes obtenidas del cultivo en Fase Verde se resuspenden en agua corriente en una dilución aproximadamente 1:3. Se añadió CO₂ a la suspensión de las células verdes en el fotobiorreactor tubular. La temperatura en el fotobiorreactor tubular se mantuvo a temperaturas por debajo de 32°C.

En lo siguiente, tenía lugar una adición no recurrente de 1 mmol de peróxido de hidrógeno al caldo de cultivo y una fermentación durante cinco días a intensidades lumínicas por debajo de 200 $\mu\text{E} \times \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y daba como resultado biomasa que contenía entre 3 y 3,5% de astaxantina en el caso de *Haematococcus*. En comparación, el cultivo sin la adición de un estresante químico llevaba como mínimo 7 días y necesitaba intensidades lumínicas entre 800 y 1.500 $\mu\text{E} \times \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para alcanzar un contenido de carotenoides de 3,5% basado en la materia seca.

El procedimiento de cultivo en Fase Roja se realizó durante de cuatro a cinco días antes de la recolección y el secado de las células. La velocidad de producción de astaxantina alcanzaba un nivel de 0,42 g/l d, lo que significa que las células de *Haematococcus* contenían aproximadamente 3% en peso de astaxantina.

III. Recolección de Haematococcus

Después del cultivo en Fase Roja de células de *Haematococcus*, siendo cada ciclo de cultivo óptimamente de aproximadamente tres a seis días, se realizó el siguiente procedimiento de recolección, basado en el hecho de que las células de *Haematococcus* (especialmente las células rojas) sedimentan fácilmente una vez recogidas del fotobiorreactor tubular. Así, la biomasa de células rojas procedente del fotobiorreactor tubular se recogió en un recipiente estándar de gran volumen desde el que puede concentrarse adicionalmente por medio de centrifugación o filtración. La fase acuosa separada podría así recogerse fácilmente y reutilizarse para un nuevo procedimiento de inoculación y cultivo en un biorreactor tubular. Se obtenía una concentración de biomasa de aproximadamente 25% en peso de sólidos después de la etapa de centrifugación. La suspensión concentrada de células rojas obtenida de la etapa de centrifugación anterior se desintegró a continuación en un molino de bolas, se estabilizó mediante la adición de 0,15% (p/p) de tocoferol natural y se secó, preferiblemente mediante secado por aspersión. El polvo secado resultante se envasó en bolsas de aluminio precargadas con nitrógeno gaseoso para eliminar el oxígeno y a continuación se almacenó.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de carotenos o carotenoides a partir de algas o cianobacterias, que comprende

(a) cultivar algas o cianobacterias que tienen capacidad para la biosíntesis de carotenos o carotenoides bajo condiciones adecuadas para el crecimiento vegetal óptimo de dichas células en la llamada “Fase Verde”, y

(b) recoger las células así obtenidas y cultivarlas a temperaturas en el intervalo de 5 a 35°C e intensidades lumínicas de 30 a 200 $\mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ en la llamada “Fase Roja”,

caracterizado porque la intensidad lumínica en la etapa (b) no se incrementa en comparación con la etapa (a) y porque las células cultivadas se someten a estrés químico añadiendo una sustancia que libera especies de oxígeno activas para la inducción de la síntesis de carotenos o carotenoides en una etapa o repetidamente a lo largo de todo el período de la Fase Roja.

2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque se cultivan algas que tienen capacidad para la biosíntesis de carotenos o carotenoides seleccionados del grupo que consiste en beta-caroteno, capsantina, bixina, capsorrubina, astaxantina, luteína, licopeno, violaxantina, criptoxantina, anteraxantina, neoxantina, cantaxantina, zeaxantina, fitoeno, fitoflueno, retinol y retinal.

3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 y/o 2, **caracterizado** porque se cultivan algas que se seleccionan del grupo que consiste en *Dunaliella sp*, *Dunaliella salina*, *Dunaliella tertiolecta*, *Haematococcus sp*, *Haematococcus pluvialis*, *Haematococcus lacustris*, *Murielopsis sp*, *Anabaena spaerica*, *Chlorella sp*, *Chlorella zo-fingiensis*, *Chlorococcum sp*, *Neosporangiococcum sp*, *Coelastrum sp* y *Scenedesmus sp*.

4. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque las células se someten a las mismas intensidades lumínicas tanto en la Fase Verde como en la Roja en el intervalo de aproximadamente 30 a 200 $\mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$.

5. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque las células se cultivan tanto en la Fase Verde como en la Roja a una temperatura en el intervalo de 5 a 35°C.

6. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque las algas se hacen crecer mixotróficamente.

7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado** porque las algas se hacen crecer mixotróficamente en la Fase Verde.

8. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 6 y/o 7, **caracterizado** porque las algas se hacen crecer mixotróficamente en la Fase Verde y el estrés tiene lugar en ausencia de los nutrientes de la Fase Verde mixotrófica.

9. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque las células se someten a estrés químico mediante la adición de sustancias que liberan especies de oxígeno activas seleccionadas de oxígeno singlete, radical oxígeno o peroxi-compuestos.

10. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** porque las células se someten a estrés químico mediante la adición de peróxido de hidrógeno.

11. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 9 y/o 10, **caracterizado** porque dichos factores de estrés químico se añaden en una cantidad de 0,05 a 5 mmol por litro de suspensión de cultivo.

12. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado** porque dichas células se inoculan en una solución de crecimiento que consiste en agua corriente a la que se añade dióxido de carbono.

13. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado** porque dichas células se cultivan en un fotobiorreactor.

14. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizado** porque dicho fotobiorreactor es un biorreactor tubular o de panel.

15. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, **caracterizado** porque la concentración inicial de células usada para el cultivo es de aproximadamente 0,1 a 0,3 $\times 10^6$ células/ml a concentraciones de células (masa seca) durante el cultivo del procedimiento de entre 0,1-8 g de biomasa seca/l.

ES 2 345 258 T3

16. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas adicionales:

(c) recolectar las células cultivadas en la etapa (b) recogiendo dichas células para formar una suspensión concentrada,

(d) añadir antioxidantes y/o emulsionantes a dicha suspensión, rompiendo las células recogidas y secándolas para obtener un producto enriquecido en carotenos o carotenoides.

17. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, **caracterizado** porque la recogida y la concentración de dichas células se llevan a cabo mediante sedimentación seguida por centrifugación o filtración bajo vacío, y en el que el secado de dichas células se realiza mediante liofilización, secado y trituración combinados o secado por aspersión.

18. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 y/o 17, **caracterizado** porque los antioxidantes se seleccionan del grupo que consiste etoxiquina, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado (BHT), tocoferoles, di-terc-butil-paracresol y galato de propilo.