

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 079**

51 Int. Cl.:
C12N 1/12 (2006.01)
C12P 23/00 (2006.01)
A23L 1/275 (2006.01)
A23K 1/16 (2006.01)
A61K 36/05 (2006.01)
A61Q 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06000599 .8**
96 Fecha de presentación: **12.01.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1808483**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.07.2007**

54 Título: **PROCEDIMIENTOS DE OBTENCIÓN DE LUTEÍNA A PARTIR DE ALGAS.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.02.2012

73 Titular/es:
COGNIS IP MANAGEMENT GMBH
HENKELSTRASSE 67
40589 DÜSSELDORF, DE y
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

72 Inventor/es:
Martin, Lucia;
Rodriguez, Herminia;
Vargas, M.Angeles;
Obraztsova, Irina;
Johannisbauer, Wilhelm;
Gutsche, Bernhard;
Cordero, Baldomero y
Weiss, Albrecht

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 374 079 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 de obtención de luteína a partir de algas

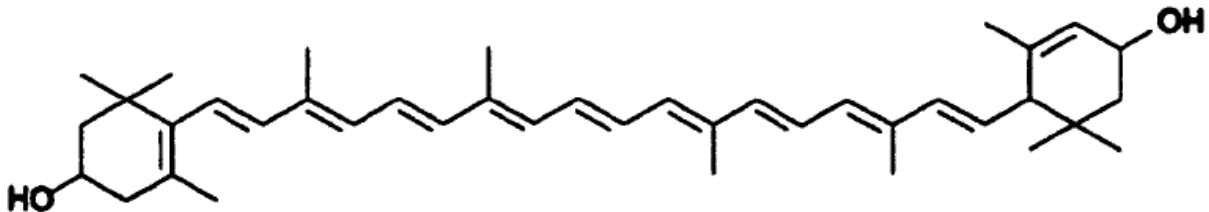
Objeto de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de luteína a partir de una cepa de *Chlorella sorokiniana* específica.

Estado de la técnica

10 La luteína, junto con la zeaxantina, es un componente esencial del pigmento macular en la retina del ojo. Un nivel bajo de consumo de este carotenoide particular aumenta el riesgo de degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y cataratas, que son las causas principales de deterioro visual y ceguera adquirida, y son cuestiones claves de calidad de vida entre millones de personas que están envejeciendo. Uno de los primeros estudios a gran escala sobre carotenoides es el Eye Disease Case Control Study (estudio de control de casos de enfermedades oculares), en el que se comparó la dieta con el riesgo de desarrollar AMD. Los resultados encontraron un riesgo significativamente inferior de desarrollar la enfermedad ocular en personas que mostraban grandes cantidades de luteína y zeaxantina en su sangre. Además, las personas que siguieron una dieta con las cantidades más altas de luteína y zeaxantina desarrollaron un riesgo significativamente inferior de AMD que aquéllas cuya dieta contenía la cantidad más baja (de tan sólo 1,2 mg al día). Estudios dietéticos confirmaron la asociación entre el consumo frecuente de espinacas o col, que son buenas fuentes particulares de luteína y zeaxantina, y el riesgo de AMD inferior. Se encontraron resultados similares en un análisis reciente de un estudio dietético de EE.UU. denominado el Third National Health and Nutrition Examination Survey (tercera encuesta nacional de examen de salud y nutrición) o NHANES III. Este análisis también mostró que consumir luteína y zeaxantina estaba asociado con un riesgo reducido de desarrollar AMD.

La luteína (3,3'-dihidroxi- β,ϵ -caroteno) representa una xantofila o carotenoide oxigenado. El sistema de dobles enlaces conjugados determina su color amarillo y es responsable de la acción biológica.



25 Luteína

30 Las propiedades fisiológicas de la luteína y particularmente su función como un antioxidante se deben a su potencial para inactivar el oxígeno singlete y extinguir radicales activos. Hasta el día de hoy, la luteína se produce principalmente de manera sintética puesto que el contenido de este carotenoide en fuentes naturales se considera que es bastante bajo para cualquier producción industrial en condiciones económicas. En el caso de cultivos heterótrofos de lote alimentado de *Chlorella protothecoides*, se obtuvo una productividad de luteína promedio de 22,7 mg l⁻¹ d⁻¹ en un fermentador de 3,7 l. (Biotechnol. Prog., 18, 723-727(2002)). *Chlorella zofingiensis* que se hizo crecer de manera autótrofa en cultivo discontinuo mostró contenidos de luteína de 20 mg/l (= 4 mg/peso seco), sin embargo crece lentamente (tiempo de duplicación de 17,3 h) y por tanto su productividad es mala [Appl. Microbiol. Biotechnol. 64, 848-654 (2004)]. *Muriellopsis* se hizo crecer de manera autótrofa en cultivo discontinuo mostrando un contenido máximo de luteína en los cultivos de 35 mg l⁻¹ y una productividad estimada de 32,6 mg l⁻¹ h⁻¹ en condiciones de crecimiento nutricionales y ambientales optimizadas [J. Biotechnol. 76, 51-59 (2000)]. Además, varias patentes reivindican el uso de diversas cepas de *Chlorella* para la producción de luteína, sin embargo, su productividad es demasiado baja para una producción industrial en condiciones económicas aceptables [documentos US 4.931291; EP 0251018 A1]. La cepa H-84 de *Chlorella sorokiniana* produce 4,3 mg luteína/g peso seco [J. Applied Phycology, 12, 263-267 (2000)]. Actualmente, la luteína se produce a partir de plantas, principalmente flores de caléndula, que requieren grandes extensiones de tierra mostrando un contenido bastante bajo de luteína.

45 El complejo problema que subyace a la presente invención ha sido por tanto desarrollar un procedimiento que permite la obtención de la luteína a partir de fuentes naturales en rendimientos superiores con comparación con el estado de la técnica, más particularmente a partir de algas que muestran simultáneamente

- una tasa de crecimiento específico μ en condiciones de luz medias de al menos $0,05 \text{ h}^{-1}$ (medidas en condiciones fototrópicas usando medios inorgánicos);
 - una producción de biomasa por volumen en irradiación con luz media y en condiciones fototrópicas usando medios inorgánicos de al menos 8 g de biomasa seca/1;
- 5
- una razón de luteína/zeaxantina de más de 5;
 - un factor obtenido mediante multiplicación de la tasa de crecimiento y productividad volumétrica de luteína de al menos $0,02 \text{ mg l}^{-1}\text{h}^{-2}$
 - una razón de clorofila a/luteína de menos de 10, y
 - una productividad de luteína volumétrica de al menos $0,2 \text{ mg l}^{-1}\text{h}^{-1}$.
- 10
- Además, el material de partida debe ser fácil de cultivar y de cosechar de modo que es posible llevar a cabo la reacción en un foto-biorreactor. Finalmente, las fuentes deben estar libres de cualquier toxina nociva o debe cultivarse en tales condiciones que no produzcan toxinas para evitar formación de toxinas nocivas, y deben ser resistentes a la contaminación.

Descripción de la invención

- 15
- La presente invención reivindica un procedimiento de obtención de antioxidantes naturales, que está caracterizado porque
- (a) se cultivan cepas de las algas verdes *Chlorella sorokiniana* SAG 211-32 en un medio de cultivo que comprende sales de ácido acético 20-60 mM y con una irradiación con luz de desde 500 hasta $1.000 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para producir luteína hasta que se alcanza un contenido deseado del antioxidante,
- 20
- (b) se cosechan las algas y se formulan para dar un producto y/o
- (c) se retira el contenido de luteína por separación de la biomasa restante.

25

Sorprendentemente, se ha encontrado que las algas verdes del tipo citado muestran una potente producción de luteína que satisface satisfaciendo los complejos requisitos tal como se indicó anteriormente, lo que permite obtener el producto de alto valor en una cantidad significativamente superior en comparación con cualquier otra alga conocida indicada en el estado de la técnica. Particularmente, *Chlorella sorokiniana* también muestra varias ventajas adicionales; en comparación con otras algas muestra crecimiento rápido (tiempo de duplicación de 3 h), no se aglutina y es fácil de manejar, de modo que es adecuada para el cultivo, especialmente en foto-biorreactores tubulares. Crece de manera autótrofa o mixotrófica en un medio mineral económico y muy simple y es resistente con respecto a la contaminación.

30 Algas verdes

Chlorella sorokiniana SAG 211-32 no sólo muestra una alta productividad con respecto a la luteína, sino que también muestra la mejor resistencia contra agentes contaminantes, la tasa de crecimiento más rápida y no se aglutina.

Condiciones de cultivo

- 35
- Se conocen muchas condiciones de cultivo y medios de cultivo para cultivos madre a escala pequeña y cultivos a gran escala de células algales. Sin embargo, para los fines de la presente invención, se encontró que las condiciones y medios de cultivo óptimos son en realidad las condiciones y medios de cultivo relativamente simples descritos a continuación en el presente documento, siendo estos por tanto los preferidos según la invención. Por ejemplo, la temperatura siempre es un factor crítico para el crecimiento de las algas. Se ha encontrado que se logran condiciones muy favorables entre 20 y 40°C con un óptimo a aproximadamente 30°C .
- 40
- En una realización adicional preferida de la invención, se hacen crecer las algas de manera mixotrófica (con nutrientes adicionales para potenciar el crecimiento de las células), más particularmente, se ha encontrado que el medio Arnon soporta el crecimiento de una manera óptima, preferiblemente si se combina con nitratos en cantidades de 10 a 60 mM, preferiblemente de aproximadamente 40 mM. La tasa de crecimiento también puede aumentarse mediante la adición de sales de ácido acético, en particular acetato de sodio, en cantidades de 20 a 60 mM,
- 45
- preferiblemente de aproximadamente 40 mM.

Finalmente, la irradiación es también un parámetro crítico. Con respecto a pruebas de selección y en planta piloto, se usan lámparas de haluro de mercurio y el cultivo se lleva a cabo con una irradiación con luz de 200 a 1.500, y preferiblemente de aproximadamente $700 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$. Para la producción, por supuesto, se prefieren las condiciones de luz natural.

5 En una realización adicional preferida de la presente invención, las células se cultivan en un foto-biorreactor, preferiblemente un foto-biorreactor de panel o tubular, que tiene la ventaja de un área de superficie muy grande con respecto a su volumen para una óptima producción a gran escala de células algales en su fase de crecimiento. Habitualmente, tales módulos de biorreactor tienen un volumen en el intervalo de desde 100 hasta 35.000 litros; dependiendo de la escala de producción que se desea, y que contienen como componentes integrales tubos disponibles comercialmente hechos de PVC, material acrílico (Plexiglass), policarbonato o vidrio, que tienen un diámetro interno de aproximadamente 3 a 5 cm. En funcionamiento, las células en cultivo se hacen circular a través del dispositivo en agua del grifo a la que se le añade CO_2 , usando una bomba. Los cultivos verdes a partir de los cultivos madre líquidos (o inóculos) se inoculan en dicho foto-biorreactor, en el que las algas se burbujan con un gas que contiene CO_2 tal como una mezcla de CO_2 en aire o CO_2 como componente de gas principal. El burbujeo y el bombeo también sirvieron para prevenir la aglutinación de las células. Para la escala de producción en un foto-biorreactor tubular, puede aplicarse CO_2 con una pureza del 90 al 100%, también se prefiere CO_2 económico de plantas industriales (por ejemplo de un proceso de cal viva).

La concentración celular inicial en el foto-biorreactor durante el procedimiento de cultivo se ajusta preferiblemente a desde aproximadamente $0,1$ hasta $0,3 \cdot 10^6$ células/ml a concentraciones celulares (masa seca) de entre $0,1 - 0,4$ g de biomasa seca/l, mediante dilución con medio de cultivo modificado reciente. La intensidad de la luz mantiene habitualmente en el intervalo de entre 200 y $1.500 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ tal como se proporciona mediante lámparas de haluro de mercurio o como luz natural. Se ha encontrado ventajoso mantener la temperatura en el foto-biorreactor en el intervalo de entre 25 y 28°C . Usando un invernadero como un cuarto de cultivo interior es fácil mantener temperaturas inferiores a 32°C en Europa del norte y central en verano. Además, el foto-biorreactor tubular y la ubicación interior tienen la ventaja de operación controlada, a largo plazo y limpia, y si el foto-biorreactor se fabrica de tubos de vidrio en lugar de plástico no requiere gran mantenimiento o renovación con el fin de funcionar durante mucho tiempo. Además, las condiciones de cultivo son extremadamente económicas ya que las células se hacen crecer en un medio mineral económico de agua del grifo con la adición de dióxido de carbono como, esencialmente, la fuente de nutrición principal.

30 Debe observarse que los rendimientos de carotenoides pueden aumentarse adicionalmente mediante factores de estrés (irradiación con luz, estrés químico, sales, pH, temperatura, estrés oxidativo).

Cosecha y recuperación de luteína

Con el fin de obtener luteína o un producto enriquecido con luteína a partir de las células algales cultivadas, se han descrito muchos procedimientos, por ejemplo, los procedimientos en el documento WO 89/006910. Aunque pueden emplearse estos procedimientos según la presente invención, el procedimiento preferido es el de la centrifugación, o sedimentación o filtración a vacío para concentrar las células, y secar las células concentradas. Entonces se almacena preferiblemente la masa celular seca a bajas temperaturas (por ejemplo, -20°C o incluso menos) en condiciones libres de oxígeno, por ejemplo, mediante envasado a vacío o, preferiblemente, mediante introducción en bolsas de plástico junto con nitrógeno (N_2) para eliminar el oxígeno.

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

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

(ii) opcionalmente añadir antioxidantes y emulsionantes a dicha suspensión, y opcionalmente

(iii) romper las células recogidas y secándolas para obtener luteína o un producto enriquecido con luteína.

45 Generalmente, la recogida y concentración de dichas células se lleva a cabo mediante centrifugación, o sedimentación o filtración a vacío, y el secado de dichas células se realiza mediante liofilización, secado y molienda combinados (molino con torbellinos de aire), o secado por pulverización.

Más particularmente, aunque cada ciclo de cultivo dura de manera óptima aproximadamente de cuatro a seis días, el siguiente procedimiento de cosecha se realiza basándose en el hecho que las células algales se sedimentan fácilmente una vez que se han recogido del foto-biorreactor. Por tanto, la biomasa celular del foto-biorreactor se recoge en un embudo de gran volumen convencional, por ejemplo un embudo Imhoff, y se deja reposar durante unas cuantas horas (aproximadamente 3-5 horas) para facilitar la sedimentación de las células. Se encontró que aproximadamente el 30% en peso del volumen total de la biomasa del biorreactor representaba el sedimento celular

mientras el aproximadamente el 70% en peso restante del volumen recogido total representaba el agua del grifo usada en el cultivo. Por tanto, este agua del grifo puede recogerse fácilmente y usarse para una nueva inoculación de biorreactor y procedimiento de cultivo (es decir, el agua de grifo originalmente usada puede reciclarse casi por completo). Entonces se recoge el cultivo celular concentrado y precipitado anterior del embudo y se somete a centrifugación o filtración a vacío para concentrar adicionalmente las células. De manera rutinaria, se obtiene un rendimiento de biomasa de aproximadamente el 40% en peso de sólidos tras la etapa de centrifugación, o de aproximadamente el 30% en peso de sólidos tras la filtración a vacío. También aquí, aproximadamente el 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 del sobrenadante, puede recogerse y usarse para otra ronda del procedimiento de cultivo, siendo este sobrenadante principalmente el agua del grifo original usada en el procedimiento.

Entonces se homogeniza la suspensión espesa celular concentrada obtenida a partir de la etapa de centrifugación anterior y se estabiliza añadiendo antioxidantes y luego se seca, preferiblemente mediante liofilización, aunque el secado por pulverización también demostró 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. El antioxidante preferido, sin embargo, es un producto de tocoferol natural que contiene el 30% en peso de alfa-tocoferol para tener al menos un producto natural real. Habitualmente, la cantidad de antioxidante añadido en el procedimiento de trituración oscilará aproximadamente entre el 0,05 y el 5% (p/p) de la cantidad de polvo seco. Los polvos se envasan en una bolsa de plástico pre-llenada con gas nitrógeno para eliminar el oxígeno (que provoca la oxidación del pigmento, es decir la degradación del principio activo) y luego se almacenan a -20°C, por ejemplo, antes del procesamiento para preparar el aditivo alimenticio.

La fase final de producción de luteína o un producto enriquecido con luteína en forma de partículas pequeñas fácilmente digeribles por seres humanos o animales también puede llevarse a cabo de varias maneras tal como se describió previamente en la técnica. Por tanto, la luteína y otros componentes algales se procesan para garantizar una alta biodisponibilidad. El procedimiento preferido implica el uso de un molino de bolas convencional en el que la suspensión espesa de biomasa se disgrega como una suspensión en agua en presencia de cualquier antioxidante adecuado para prevenir la oxidación de la luteína. Tras el secado, esto proporciona un producto de tipo polvo de tamaño de partícula pequeño.

El polvo así obtenido puede utilizarse entonces directamente o en una mezcla con otros componentes tales como un aditivo para la harina de pescado con fines de coloración o en aplicaciones alimenticias tales como complementos dietéticos. En otro procedimiento, la luteína puede concentrarse mediante un procedimiento de extracción incluyendo la extracción con disolventes supercríticos para usarlos para la formulación de productos farmacéuticos o complementos alimenticios.

Aplicación industrial

Según la enseñanza de la presente invención, se ha encontrado que determinadas algas verdes muestran una productividad sorprendentemente alta para la producción de luteína, si se cultivan en condiciones optimizadas.

Ejemplos

Análisis de luteína

Para el análisis de luteína, se extrajeron los pigmentos con metanol a 70°C, se centrifugaron, se evaporó el sobrenadante bajo N₂ en hielo y se resuspendió el sedimento en metanol, se centrifugó y se analizó mediante HPLC usando una columna de cartucho Waters Spherisorb S5 ODS 1 4,6 x 250 mm. Se detectaron los pigmentos usando un detector de red de fotodiodos.

Condiciones de crecimiento celular

Se hicieron crecer cultivos madre de microalgas de manera fotoautótrofa en un cultivo discontinuo, en 100 ml de medio de cultivo Arnon (medio Arnon, modificado para contener K₂HPO₄ 4 mM y NaNO₃ 20 mM; Arnon *et al.*, 1974) en matraces cónicos de 200 ml de capacidad e iluminados con lámparas fluorescentes a 92 μE m⁻²s⁻¹. La temperatura de cultivo era de 25°C. La selección de las cepas para la producción de luteína se realizó en las siguientes condiciones:

- Se iniciaron cultivos discontinuos fotoautótrofos en frascos Roux (750 ml) con células en la fase exponencial a partir de los cultivos madre a una densidad celular de 0,1-0,3 x 10⁶ células ml⁻¹;
- Irradiancia: continua, 460 μE m⁻² s⁻¹ (lámparas de haluro de mercurio);
- Temperatura: 28°C;

- Burbujeo: se burbujearon los cultivos con aire complementado con CO₂ al 1 % (v/v);
- Medio de cultivo: el mismo que en el caso del cultivo madre.

Se analizaron varios parámetros en las diferentes microalgas, como densidad celular, peso seco, carotenoides, pH, morfología celular y la tasa de crecimiento específico (μ). Se realizó un seguimiento del crecimiento determinando el número de células, usando un contador Coulter o mediante el peso seco (g l^{-1}). Para determinaciones de peso seco, se filtraron alícuotas de 5 ml a través de filtros Whatman previamente pesados ($1,2 \mu\text{m}$ de diámetro), se lavaron dos veces con agua destilada y se secaron a 80°C durante 24 h. Se calculó la productividad volumétrica de luteína (PVL) multiplicando la tasa de crecimiento específico máxima (μ) y la concentración de luteína máxima en la fase exponencial (LMFE). Para crecimiento mixotrófico, se complementaron los cultivos con acetato de sodio de 5 a 60 mM y para la optimización de nitrato se complementaron los medios con nitrato de sodio de 10 a 40 mM. Para la optimización de la irradiancia, se sometieron a ensayo irradiancias con luz de desde $92 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ hasta $1.500 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. La temperatura osciló entre 22°C y 40°C en el experimento para optimización de la temperatura.

Selección de cepas de microalgas verdes

Las siguientes tablas 1 y 2 muestran una comparación de diferentes cepas de microalgas verdes con respecto a la productividad para luteína (P) y el factor "tasa de crecimiento específico" multiplicado por la "productividad de la luteína". Tal como se indicó anteriormente, las algas se cultivaron en medio Arnon + NO₃⁻ 20 mM a 28°C , la irradiancia fue de 100Wm^{-2} ($460 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$). En general, las microalgas verdes muestran alto contenido en luteína y bajo contenido en zeaxantina. *Chlorella sorokiniana* (SAG 211-32), *Chlorococcum citrifforme* (SAG 62.80) y *Neosporangiococcus gelatinosum* (SAG 64.80) mostraron las tasas de crecimiento específico (P) más altas, desde $0,13 \text{h}^{-1}$ (*Chlorococcum citrifforme*) hasta $0,17 \text{h}^{-1}$ (*Chlorella sorokiniana*). En particular, *Chlorella sorokiniana* y *Neosporangiococcus gelatinosum* mostraron la producción de luteína más alta ($24,0\text{-}25,2 \text{mg l}^{-1} \text{día}^{-1}$).

Tabla 1

Productividad de las microalgas verdes para luteína					
Cepas / resultados	μ [h^{-1}]	DCM [células l^{-1}]	BMV [g l^{-1}]	CLVM [mg l^{-1}]	CLM [$\text{mg g}^{-1}\text{PS}$]
<i>Chlorella sorokiniana</i> SAG 211-32	0,17	$1,5 \cdot 10^{11}$	16,5	33,3	3,4
<i>Neosporangiococcus gelatinosum</i> SAG 64.80	0,15	$2,8 \cdot 10^{10}$	9,0	41,5	7,2
<i>Chlorococcum citrifforme</i> SAG 62,80	0,13	$6,7 \cdot 10^9$	8,1	60,9	7,6
<i>Chlorella fusca</i> SAG 211-8b	0,05	$2,0 \cdot 10^{11}$	16,4	34,0	2,5
<i>Scenedesmus armatus</i> UTEX 2533	0,07	$5,4 \cdot 10^{10}$	9,0	27,6	3,9
<i>Scenedesmus vacuolatus</i> SAG 211-15	0,07	$3,6 \cdot 10^{11}$	14,0	40,5	3,0
<i>Muriellopsis</i> sp.	0,05	$2,2 \cdot 10^{11}$	13,0	40,0	3,1
<i>Monoraphidium braunii</i> SAG 202. 7d	0,04	$2,0 \cdot 10^{11}$	9,0	32,6	3,6
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC621 (-)	0,08	$3,0 \cdot 10^{10}$	2,0	5,3	
<i>Scenedesmus obliquus</i> UTEX 393	0,07	$7,4 \cdot 10^{10}$	10,0	15,3	2,8

(continuación)

Productividad de las microalgas verdes para luteína					
Cepas / resultados	μ [h ⁻¹]	DCM [células l ⁻¹]	BMV [g l ⁻¹]	CLVM [mg l ⁻¹]	CLM [mg g ⁻¹ PS]
<i>Chlorella zofingiensis</i> SAG 211-14	0,05	7,0 10 ¹⁰	8,8	23,1	2,6
<i>Chlorella luteoviridis</i> UTEX 258	0,10	2,3 10 ¹⁰	1,8	2,0	1,9

DCM = densidad celular máxima; BMV = biomasa máxima por volumen; CLVM = concentración de luteína volumétrica máxima ; CLM = concentración de luteína máxima ; PS= peso seco

Tabla 2

Productividad de las microalgas verdes para luteína (II)				
Cepas / resultados	PVL [mg l ⁻¹ h ⁻¹]	DCM CLM	CLM CZM	CLM PSM
<i>Chlorella sorokiana</i> SAG 211-32	1,0	4,4 10 ¹⁰	8,5	0,21
<i>Neosporangiococcus gelatinosum</i> SAG 64.80	1,05	3,9 10 ⁹		0,80
<i>Chlorococcum citrifforme</i> SAG 62.80	0,70	8,8 10 ⁸		0,94
<i>Chlorella fusca</i> SAG 211-8b	0,17	8,0 10 ¹⁰	0,42	0,15
<i>Scenedesmus armatus</i> UTEX 2533	0,35	1,4 10 ¹⁰		0,43
<i>Scenedesmus vacuolatus</i> SAG 211-15	0,12	1,2 10 ¹¹	0,53	0,21
<i>Muriellopsis sp.</i>	0,19	7,1 10 ¹⁰	1,6	0,24
<i>Monoraphidium braunii</i> SAG 202.7d	0,15	5,6 10 ¹⁰	0,43	0,40
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC621 (-)	0,18			
<i>Scenedesmus obliquus</i> UTEX 393	0,21	2,6 10 ¹⁰	3,5	0,28
<i>Chlorella zofingiensis</i> SAG 211-14	0,10	2,7 10 ¹⁰	0,87	0,30
<i>Chlorella luteoviridis</i> UTEX 258	0,11	1,2 10 ¹⁰	3,2	1,06

PVL = productividad volumétrica de luteína; DCM = densidad celular máxima; CLM = concentración de luteína máxima ; CZM = concentración de zeaxantina máxima; PSM= peso seco máximo

5

Cinética de la acumulación de carotenoides

5 La tabla 3 presenta la cinética de la acumulación de diferentes carotenoides en la cepa seleccionada para producción de luteína (*Chlorella sorokiniana*, SAG 211-322). Tal como se mencionó anteriormente, la luteína es el carotenoide principal y, no sólo zeaxantina, sino también todos los otros carotenoides están presentes o bien en cantidades muy pequeñas o bien no detectadas. El contenido de luteína en los cultivos aumentó con el tiempo, cambiando desde 5,9 en la fase exponencial hasta 33,0 mg l⁻¹ en la fase estacionaria. Los carotenoides totales también aumentaron con el tiempo desde 7,0 hasta 37,1 mg l⁻¹.

Tabla 3

Cinética de la acumulación de carotenoides [mg l ⁻¹]						
Tiempo Carotenoides	[h]	Fase exponencial	Fase de desaceleración		Fase estacionaria	
		48	102	220	289	342
Violaxantina	0,2	0,4	0,7		0,7	0,9
Astaxantina	-	-	-		-	-
Anteraxantina	0,1	0,2	0,2		0,2	0,3
Luteína	5,9	11,0	21,0		24,0	33,0
Zeaxantina	-	-	-		-	0,4
Cantaxantina	-	0,3	0,4		0,4	.07
β-Criptoxantina	-	-	-		-	-
Licopeno	-	-	-		-	-
α-caroteno	0,2	0,4	0,1		0,2	0,2
β-caroteno	0,6	0,9	1,2		1,5	1,6
Carotenoides totales	7,0	13,2	23,6		27,0	37,1

Efecto de la irradiancia

10 En las siguientes tablas 4, 5 y 6, se facilitan parámetros optimizados con respecto a la irradiancia, temperatura y concentración nitrato/acetato para *Chlorella sorokiniana*. Se estudió el efecto de la irradiancia de la luz sobre el crecimiento celular y la producción de luteína en el intervalo de desde 92 hasta 1495 μE m⁻² s⁻¹. La tasa de crecimiento específico aumenta con la irradiancia hasta 690 μE m⁻²s⁻¹ y se mantuvo constante a valores de intensidad de luz superiores. Además, el contenido de luteína máximo en la fase exponencial también aumentó con la irradiancia, mostrando un óptimo a 690 μE m⁻² s⁻¹, que se duplicó cuando la irradiancia aumentó desde 460 hasta 690 μE m⁻²s⁻¹ y disminuyó ligeramente a irradiancias superiores. La producción de luteína siguió la misma tendencia, obteniendo 117,6 mg l⁻¹ día⁻¹ a 690 μE m⁻²s⁻¹

15

Tabla 4

Efecto de la irradiancia de la luz						
Irradiancia [$\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$]	μ [h ⁻¹]	DCM [células ⁻¹]	LMFE [mg l ⁻¹]	CLM [mg g ⁻¹ PS]	Producción de luteína	
					mg l ⁻¹ h ⁻¹	mg l ⁻¹ d ⁻¹
92	0,30	1,4 10 ¹¹	3,2	5,2	0,96	23,0
230	0,40	1,3 10 ¹¹	5,3	5,0	2,12	50,9
368	0,43	1,3 10 ¹¹	6,4	5,6	2,75	66,0
460	0,45	1,5 10 ¹¹	4,8	3,3	2,16	51,8
690	0,49	1,7 10 ¹¹	10,0	4,0	4,90	117,6
920	0,49	1,3 10 ¹¹	7,9	3,7	3,90	93,6
1495	0,49	1,4 10 ¹¹	8,8	3,9	4,31	103,5

LMFE= concentración de luteína máxima en la fase exponencial

Efecto de la temperatura

5 La tabla 5 muestra el efecto de la temperatura sobre el crecimiento celular, contenido de luteína y productividad de la luteína en *Chlorella sorokiniana*. La tasa de crecimiento específico, contenido de luteína volumétrico máximo en la fase exponencial y productividad de la luteína aumentaron cuando se elevó la temperatura, alcanzando un máximo a 28°C y se mantuvo en este nivel incluso a una temperatura superior de 40°C.

Tabla 5

Efecto de la temperatura						
Temperatura [°C]	μ [h ⁻¹]	DCM [células ⁻¹]	LMFE [mg l ⁻¹]	CLM [mg g ⁻¹ PS]	Producción de luteína	
					mg l ⁻¹ h ⁻¹	mg l ⁻¹ d ⁻¹
22	0,16	1,2 10 ¹¹	5,3	4,2	0,85	20,4
25	0,17	1,2 10 ¹¹	6,5	4,1	1,10	26,4
28	0,25	1,3 10 ¹¹	7,4	4,3	1,85	44,4
32	0,25	1,0 10 ¹¹	6,1	4,3	1,53	36,7
36	0,25	8,2 10 ¹⁰	7,0	4,0	1,75	42,0
40	0,26	7,1 10 ¹⁰	7,0	3,8	1,82	43,7

10 Efecto de la concentración de nitrato

La tasa de crecimiento específico fue muy similar cuando se potenció la concentración de nitrato en el medio desde 10 hasta 40 mM, tal como puede observarse en la tabla 6. Sin embargo, el contenido de luteína volumétrico máximo en la fase exponencial aumentó significativamente (40%) cuando se elevó la concentración de nitrato en el medio

desde 10 hasta 30 mM, manteniéndose constante a 40 mM y el contenido de luteína máximo al final del cultivo aumentó tres veces cuando se elevó la concentración de nitrato desde 10 hasta 40 mM. Además, la productividad de la luteína se potenció en aproximadamente el 50 %, a medida que se aumentó la concentración de nitrato en el medio desde 10 hasta 40 mM.

5

Tabla 6

Efecto de la concentración de nitrato						
Nitrato [mM]	μ [h^{-1}]	DCM [células $^{-1}$]	LMFE [$mg\ l^{-1}$]	CLM [$mg\ g^{-1}PS$]	Producción de luteína	
					$mg\ l^{-1}h^{-1}$	$mg\ l^{-1}d^{-1}$
10	0,34	$5,0\ 10^{10}$	5,7	3,3	1,94	46,6
20	0,34	$5,0\ 10^{10}$	6,0	3,3	2,04	49,0
30	0,35	$6,0\ 10^{10}$	8,0	3,9	2,80	67,2
40	0,36	$6,5\ 10^{10}$	8,0	4,2	2,88	69,1

Efecto de la concentración de acetato

El efecto del acetato (crecimiento mixotrófico) sobre el crecimiento celular, contenido de luteína y productividad de la luteína se muestra en la tabla 7. La tasa de crecimiento específico aumentó desde 0,46 hasta 0,55 h^{-1} cuando se aumentó el acetato en el medio desde 0 hasta 20 mM, manteniéndose constante a concentraciones de acetato superiores de hasta 60 mM. El contenido de luteína volumétrico máximo en la fase exponencial se duplicó desde 5,5 hasta 11 $mg\ l^{-1}$ a medida que se elevó el acetato en el medio desde 0 hasta 40 mM, manteniendo este valor después de eso. Con respecto a la productividad de la luteína, se potenció 2,4 veces, alcanzando valores de 145,2 $mg\ l^{-1}d^{-1}$, cuando se aumentó la concentración de acetato en el medio desde 0 hasta 40 mM, sin aumentar en concentraciones superiores de acetato.

15

Tabla 7

Efecto de la concentración de acetato						
Acetato [mM]	μ [h^{-1}]	DCM [células $^{-1}$]	LMFE [$mg\ l^{-1}$]	CLM [$mg\ g^{-1}PS$]	Producción de luteína	
					$mg\ l^{-1}h^{-1}$	$mg\ l^{-1}d^{-1}$
0	0,46	$1,1\ 10^{11}$	5,5	3,8	2,53	60,7
20	0,55	$1,3\ 10^{11}$	8,7	5,0	4,78	114,7
30	0,54	$1,2\ 10^{11}$	9,7	5,1	5,23	125,5
40	0,55	$1,4\ 10^{11}$	11,0	5,2	6,05	145,2
50	0,55	$1,2\ 10^{11}$	10,5	4,6	5,77	138,5
60	0,52	$1,3\ 10^{11}$	11,0	4,8	5,72	137,3

Efectos combinados de la concentración de acetato e irradiancia de la luz

El efecto combinado de la concentración del acetato y la irradiancia de la luz sobre el crecimiento, contenido de luteína y productividad de la luteína también se ha estudiado en *Chlorella sorokiniana*, tal como puede observarse en la tabla 8. La tasa de crecimiento específico y el contenido de luteína volumétrico máximo en la fase exponencial

20

sólo aumentó ligeramente cuando se elevó la irradiancia desde 460 hasta 690 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, para ambas concentraciones de acetato usadas en el experimento. La producción de luteína fue alrededor de un 30% superior en un medio que contenía acetato 20 mM cuando aumentó la irradiancia de la luz, desde 460 hasta 690 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Sin embargo, sólo pudo observarse un pequeño efecto de la irradiancia sobre la productividad cuando el acetato en el medio era de 30 mM.

5

Tabla 8

Efecto de la irradiancia de la luz y la concentración de acetato							
Acetato [mM]	Irradiancia [$\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$]	μ [h^{-1}]	DCM [células $^{-1}$]	LMFE [mg l^{-1}]	CLM [$\text{mg g}^{-1}\text{PS}$]	Producción de luteína	
						$\text{mg l}^{-1}\text{h}^{-1}$	$\text{mg l}^{-1}\text{d}^{-1}$
0	460	0,46	$1,1 \cdot 10^{11}$	5,5	3,8	2,53	60,7
20	460	0,55	$1,3 \cdot 10^{11}$	8,7	5,0	4,78	114,7
20	690	0,60	$1,0 \cdot 10^{11}$	10,5	4,7	6,30	151,2
30	460	0,54	$1,2 \cdot 10^{11}$	9,7	5,1	5,23	125,5
30	690	0,59	$1,1 \cdot 10^{11}$	10,0	3,7	5,90	141,6

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de antioxidantes naturales, caracterizado porque
 - (a) se cultivan cepas de las algas verdes *Chlorella sorokiniana* SAG 211-32 en un medio de cultivo que comprende sales de ácido acético de 20 a 60 mM y con una irradiación con luz de desde 500 hasta 1.000 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para producir luteína hasta que se alcanza un contenido deseado del antioxidante,
 - (b) se cosechan las algas y se usan como producto y/o
 - (c) se retira el contenido de luteína por separación de la biomasa restante.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el cultivo de las algas se realiza a una temperatura de desde 20 hasta 40°C.
- 10 3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y/o 2, caracterizado porque el cultivo se realiza usando un medio de cultivo mixotrófico.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 anteriores, caracterizado porque el cultivo se realiza con estrés.
- 15 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 anteriores, caracterizado porque el cultivo se realiza en un foto-biorreactor.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 anteriores, caracterizado porque se recogen las células cultivadas en la etapa (b) para formar una suspensión concentrada, opcionalmente se añaden antioxidantes y emulsionantes a dicha suspensión, y opcionalmente se rompen las células recogidas y se secan para obtener luteína o un producto enriquecido con luteína.