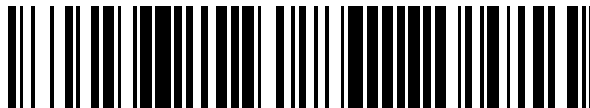


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 097**

51 Int. Cl.:

C12N 1/12 (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)

A23L 1/275 (2006.01)

C12P 23/00 (2006.01)

A61K 36/05 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08014415.7**

96 Fecha de presentación: **13.08.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2157167**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.02.2010**

54 Título: **PROCESO PARA OBTENER LUTEÍNA A PARTIR DE ALGAS VERDES.**

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:
**Vargas, Angeles M.;
Martin, Lucia;
Cordero, Baldomero F.;
Obraztsova, Irina;
Rodriguez Martinez, Herminia;
Verseck, Stefan;
Gerfertz-Martinez, Claudia;
Gutsche, Bernhard y
Weiss, Albrecht**

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

ES 2 374 097 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

Proceso Para Obtener Luteína a Partir de Algas Verdes

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con el área de la biotecnología y se refiere a un nuevo proceso para obtener luteína de ciertos mutantes de las algas verdes y el uso de dichos mutantes para obtener luteína.

Antecedentes de la invención

10 Los carotenoides se sintetizan mediante todos los organismos fotosintéticos así como también mediante algunas bacterias u hongos no fotosintéticos. Existen dos clases principales de carotenoides que se presentan en la naturaleza: carotenos, que son hidrocarburos que son lineales o ciclizados en uno o ambos extremos de la molécula y xantófilos, que son derivados oxigenados de carotenos. En las microalgas se puede hacer una distinción entre los carotenoides primarios y secundarios. Los carotenoides primarios, como luteína, funcionan como pigmentos accesorios en los fotosistemas, como componentes estructurales de complejos que recolectan luz en los cloroplastos, así como también agentes fotoprotectores y por lo tanto son esenciales para la supervivencia celular. Los carotenoides secundarios, como astaxantina, se acumulan en grandes cantidades en cuerpos de lípidos fuera de los cloroplastos, después de someter las células a condiciones de tensión. El papel de los carotenoides secundarios en células de algas no se entiende completamente. Estos pueden funcionar como filtros fotoprotectores y como antioxidantes que evitan la acumulación de los radicales de oxígeno.

20 La luteína se utiliza como tinte de alimentos y especialmente como aditivos de alimento en acuicultura y avicultura; también se utiliza para la coloración de fármacos y cosméticos. Durante los últimos años, se han encontrado aplicaciones adicionales para luteína, especialmente en el campo de la salud humana. La luteína se utiliza como un nutracéutico contra degeneración macular. Se sabe que la luteína y zeaxatina cumplen una función crítica en mantener una función visual normal. Además del desarrollo de cataratas, también la progresión de aterosclerosis temprana parece estar impedida por la luteína. En los caninos y felinos, se ha probado que la luteína mejora la respuesta inmune tumoral y mediada por célula (Kim et al. 2000). La luteína también puede servir para proteger la piel del daño inducido por UV. El mercado global de luteína se ha incrementado marcadamente en los últimos años y se espera que alcance USD \$ 187 millones en el 2009. Actualmente la fuente comercial de luteína es Marigold (*Tagetes erecta* y *Tagetes patula*). Sin embargo, el contenido de luteína de flores Marigold es bajo (0.3 mg g⁻¹ DW), y por lo tanto hay un aumento interesante en las microalgas como fuente alternativa de este carotenoide. Por ejemplo, las micro-algas *Muriellopsis* sp., *Chlorella zofingiensis*, *Scenedesmus almeriensis* y *Chlorella protothecoides* ya se han propuesto como fuentes potenciales de luteína. No obstante, las productividades de luteína descritas no son suficientemente altas para ser económicamente factibles en una escala industrial.

La EP-A-1 808 483 describe un proceso para obtener luteína a partir de algas, utilizando *Chlorella sorokiniana* (SAG 211-32).

35 Por lo tanto el problema de fondo de la presente invención ha sido satisfacer la necesidad de mejorar la acumulación y productividad de luteína, al seleccionar una cepa adecuada, optimizando las condiciones de cultivo y obteniendo superproducción de mutantes de luteína.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se relaciona con un proceso para obtener luteína a partir de algas que se caracteriza por

40 (a) las algas verdes seleccionadas de un grupo de cepas mutantes de *Chlorella sorokiniana* (SAG 211-32) identificadas por las referencias de depósito CCAP

(i) CCAP 211-93

(ii) CCAP 211-94

(iii) CCAP 211-95

(iv) CCAP 211-96

45 se cultivan para producir luteína hasta que se logra un contenido deseado del antioxidante,

(b) las algas se cosechan y se utilizan como un producto y/o

(c) el contenido de luteína se separa del resto de la biomasa.

Con el fin de evitar cualquier ambigüedad se establece que las cepas mutantes (i) a (iv) se han depositado antes del día de la presente solicitud ante la Colección de Cultivo de Algas y Protozoarios (CCAP) bajo los números de acceso dados, todos bajo los términos del Tratado de Budapest. Las cepas de algas se describen aquí completamente y están abiertas al público.

De forma sorprendente se ha observado que los mutantes de *Chlorella sorokiniana* exhiben una productividad de luteína aumentada comparado con la forma natural. En particular, los mutantes muestran un mayor contenido en luteína, que mantiene el mismo índice de crecimiento como en la cepa natural.

10 Mutagenia

En el caso de mutagenia artificial existen diversas opciones conocidas en la técnica. Se pueden inducir mutaciones sobre la base de mutágenos químicos o físicos así como también sobre la base de sustancias activas biológicas. Entre los mutágenos químicos, físicos y biológicos se conocen en la técnica diversos compuestos útiles de los cuales son particularmente útiles los siguientes.

15 Por ejemplo tales mutágenos o noxa son de interés particular los cuales se seleccionan del grupo que consiste de agentes de intercalación, agentes alquilantes, agentes desaminantes, análogos base, radiación electromagnética que comprende radiación radioactiva, y rayos x, radiación ionizante, temperatura elevada o de luz ultravioleta, sustancias biológicas activas que comprenden transposones que incluyen las tecnologías conocidas conectadas que comprende tecnologías recombinantes de gen, mutagenia de transposón y similares. Sin embargo, las mutaciones con base en una mutación espontánea también se incluyen en este contexto. En particular, entre los agentes de intercalación son bien conocidos los derivados acridina o los derivados fenantridina tal como bromuro de etidio también conocidos como bromuro de 2,7-diamino-10-etil-6-fenilfenantridio o bromuro de 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridinio. Como los compuestos de agentes alquilantes también son útiles tales como derivados nitrosoguanidina o etil metanosulfonato; etil etanosulfonato, ácido nitroso, o HNO₂. Sin embargo, con respecto a los derivados de nitrosoguanidina el compuesto N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina es de interés particular con el fin de llevar a cabo la presente invención. Con relación a los análogos base se pueden utilizar el compuesto 5-bromo-uracilo, que también se conoce como 5-bromodesoxiuridina desoxinucleosida, o 2-aminopurina.

Entre los transposones existen una cantidad de métodos publicados en la literatura que describen la mutagenia de transposón. Por ejemplo, retrotransposones o transposones DNS, por ejemplo transposón de fago Mu, o transposón marcado, son bien conocidos y están disponibles para la inducción de mutaciones. Adicionalmente, también se puede lograr mutagenia dirigida a sitio al utilizar tecnologías conocidas tales como mutagenia de inserción de ligador, generación de mutantes de eliminación o mutagenia dirigida a oligonucleótidos. En general, se incluyen todos los métodos biológicos conocidos con base en recombinación de gen dentro del contexto de los métodos anteriores. Debido a que la persona experta es consciente de la gran variedad de literatura adecuada no hay necesidad de citar otra literatura específica.

Los micro-organismos que se van a mutagenizar se pueden exponer al mutágeno o los agentes que inducen mutación o noxa de acuerdo con cualesquier métodos conocidos. Sin embargo, de acuerdo con la presente invención, se prefiere que la mutagenia artificial se realice con por lo menos un mutágeno químico, en particular con un compuesto alquilante, más particular con un compuesto nitroso, especialmente con un derivado nitrosoguanidina. Entre los derivados nitrosoguanidina se prefiere el compuesto N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina. En general la mutagenia se puede llevar a cabo al exponer una cantidad adecuada de células de las algas fotoautotróficas que se van a mutagenizar a un mutágeno o agente que induce mutágeno dentro de un tiempo y condiciones apropiadas.

En particular, se puede realizar mutagenia al suspender las células que se van a mutagenizar en un regulador esterilizado o en agua esterilizada en una cantidad entre 10⁷ a 10⁹ células, por ejemplo exhibe una densidad de aproximadamente 10⁸ células, o al rociarlas sobre una placa agar y exponerlas al mutágeno. En el caso de un medio líquido en el que se suspenden las células se ha encontrado que es un agente alquilante, en particular un derivado nitrosoguanidina, preferiblemente N-metil-N'-nitronitrosoguanidina (NG) es efectivo para producir mutantes, que son de valor particular para el propósito de la presente invención. Se puede realizar mutagenia en un medio líquido como se mencionó anteriormente en matraces adecuados de un volumen entre 5000 ml y 1 ml o entre 1000 ml y 2 ml entre 0° C y 40° C, en particular entre 5° C y 30° C, preferiblemente en una temperatura entre 20° y 25° C, que significa a temperatura ambiente. En el caso de un mutágeno físico tal como cultivo de rayos x o luz UV se prefiere una placa agar.

El tiempo de exposición de las células al mutágeno depende de la naturaleza del mutágeno que se va a utilizar. En particular, si se utiliza un mutágeno químico, tal como un derivado nitrosoguanidina, por ejemplo N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina (NG), el momento de poner en contacto las células con el mutágeno está entre 1 minuto y 24 horas, preferiblemente entre 30 minutos y 6 horas, más preferiblemente entre 1.0 y 3.0 horas, por ejemplo una hora. La concentración del mutágeno químico se puede seleccionar fácilmente sobre la base de la viabilidad de las células al mutágeno. En el caso de un mutágeno químico tal como un agente alquilante como se mencionó anteriormente, por ejemplo N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina, puede ser aconsejable conducir una serie de pruebas simples con el fin de determinar el índice de viabilidad de las células que se van a mutagenizar.

Se ha encontrado particularmente útil obtener los mutantes que producen super luteína de mutagenia clásica utilizando N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina y una estrategia de selección consecutiva con base en la resistencia a los herbicidas (norflurazón y nicotina), así como también sobre la base de un alto índice de crecimiento. Más particularmente, se han obtenido mutantes de la cepa *Chlorella sorokiniana* SAG 211/32, utilizando N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina (NG) y seleccionados sobre la base de la resistencia de células mutadas a los herbicidas norflurazón o nicotina.

Con base en los resultados de cuatro mutantes resistentes a norflurazón o nicotina se seleccionan con respecto al crecimiento y el contenido de luteína. El mejor mutante MR-16, resistente a la nicotina exhibe un aumento en la producción volumétrica de luteína de 106 % y en el contenido de luteína de peso seco de 42 % al final de la fase de desaceleración cuando se compara con la cepa tipo natural. Estos cuatro mutantes muestran crecimiento aún mejor o similar que la cepa tipo natural, que indica que pueden obtener mayores productividades de luteína.

Condiciones de cultivo

Se conocen muchas condiciones de cultivo y medios de cultivo para cultivos de solución madre a pequeña escala y cultivos a gran escala de células de algas. Sin embargo, para los propósitos de la presente invención, se encuentra que las condiciones óptimas de cultivo y medio son actualmente las condiciones de cultivo y medio relativamente simples descritas aquí adelante, estas por lo tanto se prefieren de acuerdo con la invención. Por ejemplo, la temperatura es siempre un factor crítico para el crecimiento de algas. Se ha encontrado que se logran condiciones muy favorables entre 20 y 40 °C con un óptimo a aproximadamente 30 °C.

En una realización preferida adicional de la invención, las algas se hacen crecer mixotróficamente (sin nutrientes adicionales para mejorar el crecimiento celular), más particularmente, entre el medio se ha encontrado soporte del crecimiento en una forma óptima, preferiblemente si se combina con nitratos en cantidades de 10 a 60 mM, preferiblemente aproximadamente 40 mM. El índice de crecimiento también se puede aumentar mediante la adición de sales de ácido acético, en particular acetato de sodio, en cantidades de 20 a 60 mM, preferiblemente aproximadamente 40 mM.

Finalmente, la irradiación también es un parámetro crítico. En cuanto a se refiere a las pruebas de planta piloto y detección, se utilizan lámparas de haluro de mercurio y el cultivo se lleva a cabo bajo una irradiación de 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 condiciones de luz natural.

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 un área de superficie muy grande con respecto a su volumen para producción óptima a gran escala de las células de algas en su fase de crecimiento. Usualmente, tales módulos de biorreactor tienen un volumen en el rango de 100 a 35,000 litros; dependiendo de la escala de producción que se desea, y que como componentes integrales contienen tubos comercialmente disponibles hechos de PVC, acrílico (plexiglass), policarbonato o vidrio, que tienen un diámetro interno de aproximadamente 3 a 5 cm. En operación, las células de cultivos se hacen circular a través del dispositivo en agua de grifo al que se agrega aire con CO_2 , utilizando una bomba. Los cultivos verdes provenientes de los cultivos madre líquidos (o inóculos) se inoculan en dicho fotobiorreactor, en el que las algas se purgan con un gas que contiene CO_2 similar a una mezcla de CO_2 en aire o CO_2 como el componente de gas principal. La purga y el bombeo también sirven para evitar el agrupamiento de las células. Para producción a escala en un fotobiorreactor tubular, se puede aplicar 90 a 100% de CO_2 puro, también se prefiere CO_2 económico de plantas industriales (por ejemplo de un proceso cal viva).

La concentración celular inicial en el fotobiorreactor durante el proceso del cultivo se ajusta preferiblemente de aproximadamente 0.1 a 0.3×10^6 células/ml en concentraciones celulares (masa seca) entre 0,1 - 0.4 g de biomasa seca /l, mediante dilución con medio de cultivo modificado fresco. La intensidad de la luz se mantiene en el rango de entre 200 y 1,500 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ cuando se proporciona mediante lámparas de haluro de mercurio o como luz natural. Se ha encontrado ventajoso mantener la temperatura en el fotobiorreactor en el rango entre 25 y 28 °C. Al utilizar un invernadero en una sala de cultivo en interior es fácil mantener las temperaturas por debajo de 32 °C en Europa central y norte en tiempo de verano. Adicionalmente, el fotobiorreactor tubular y la ubicación interna tienen la ventaja

de operación controlada, a largo plazo y limpia, y si el fotobiorreactor se hace en tubos de vidrio en lugar de plástico no requiere mantenimiento extensivo o remodelamiento con el fin de operar durante un largo tiempo. Adicionalmente, las condiciones de cultivo son extremadamente económicas en las células que se hacen crecer en un medio de mineral económico de agua de grifo con la adición de dióxido de carbono como, esencialmente, la fuente de nutrientes principales.

Cabe entender que el establecimiento de las producciones de luteína se puede mejorar adicionalmente en el caso del cultivo de las cepas que se conduce bajo factores de tensión, como por ejemplo radiación aumentada, reducción en la cantidad de nutrientes o adición de químicos como por ejemplo peróxidos.

Cosecha y recuperación de luteína

Con el fin de obtener luteína o un producto enriquecido con luteína de las células de algas cultivadas, se han descrito muchos procedimientos, por ejemplo, los procedimientos en la WO89/006910. Aunque se pueden emplear estos procedimientos de acuerdo con la presente invención, el procedimiento preferido es aquel de centrifugación, o sedimentación o filtración bajo vacío para concentrar las células, y secar las células concentradas. La masa celular seca luego se almacena preferiblemente a temperaturas bajas (por ejemplo, - 20° C o aún menores) bajo condiciones libres de oxígeno, por ejemplo, mediante empaque por vacío o, preferiblemente, mediante introducción en bolsas de plástico junto con nitrógeno (N₂) para eliminar el oxígeno.

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

(i) Cosechar las células cultivadas en la etapa (b) al recolectar dichas células para formar una suspensión concentrada,

(ii) opcionalmente agregar antioxidantes y emulsificantes a dicha suspensión, y opcionalmente

(iii) interrumpir las células recolectadas y secarlas para obtener una luteína o un producto enriquecido con luteína.

De manera general, la recolección y concentración de dichas célula se lleva a cabo mediante centrifugación, o sedimentación o filtración bajo vacío, y el secado de dichas células se hace mediante liofilización, secado combinado y molido (molido con vórtice de aire), o secado por rociado.

Más particularmente, aunque cada ciclo de cultivo dura óptimamente aproximadamente cuatro a seis días, se realiza el siguiente procedimiento de cosecha con base en el hecho de que las células de algas se sedimentan fácilmente una vez se recolectan del fotobiorreactor. Así, la biomasa celular del fotobiorreactor se recolecta en un embudo de volumen grande estándar, por ejemplo un embudo Imhoff, y se deja reposar durante unas pocas horas (aproximadamente 3-5 horas) para facilitar la sedimentación de las células. Se encuentra que aproximadamente 30 % b.w. del volumen total de biomasa del biorreactor representa el sedimento celular mientras que el resto aproximadamente. 70 % b.w. del volumen total recolectado representa el agua de grifo utilizada en el cultivo. Esta agua de grifo así se puede recolectar fácilmente y se utiliza para una nueva inoculación del biorreactor y el procedimiento de cultivo (es decir, el agua de grifo utilizada originalmente es casi completamente reciclable). El cultivo celular concentrado y precipitado anteriormente luego se recolecta del embudo y se somete a centrifugación o filtración por vacío para concentrar adicionalmente las células. De forma rutinaria, se obtiene una producción de biomasa de aproximadamente 40% b.w. de sólidos siguiendo la etapa de centrifugación, o aproximadamente 30% b.w. de sólidos siguiendo filtración por vacío. Aquí, también, aproximadamente 60 % b.w. del volumen total se somete a centrifugación, o aproximadamente 70 % b.w. del volumen total se somete a filtración por vacío, que es el volumen de sobrenadante, también se puede recolectar y se utiliza para otra ronda del procedimiento de cultivo, este sobrenadante es el agua de grifo original principalmente utilizada en el procedimiento.

La suspensión celular concentrada obtenida de la etapa de centrifugación anterior luego se homogeniza y estabiliza al agregar anti-oxidantes y luego se seca, preferiblemente mediante liofilización, aunque el secado por rociado también prueba ser efectivo. Tales antioxidantes se seleccionan del grupo que consiste de etoxiquina, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado (BHT), tocoferoles, di-tert-butil-paracresol y propil galato. El antioxidante preferido, sin embargo, es un producto de tocoferol natural que contiene 30 % b.w. del alfa tocoferol que tiene por lo menos un producto natural real. Usualmente, la cantidad de antioxidante agregado en el procedimiento de molido variará de aproximadamente 0.05 a 5 % (p/p) de la cantidad de polvo seco. Los polvos se empaquetan en una bolsa plástica precargada con gas de nitrógeno para eliminar el oxígeno (que origina oxidación de pigmento, es decir degradación del activo) y luego se almacenan a -20 °C antes, por ejemplo, mediante procesamiento al preparar el aditivo alimenticio.

La etapa final para producir una luteína o un producto enriquecido con luteína en la forma de partículas pequeñas que se digiere fácilmente por los humanos o animales también se puede llevar a cabo en un número de formas

como se describió previamente en la técnica. Así, la luteína y otros componentes de algas se procesan para asegurar una alta biodisponibilidad. El procedimiento preferido involucra el uso de un molino de bolas estándar en el que la suspensión de biomasa se desintegra como una suspensión en agua en la presencia de cualquier anti-oxidante adecuado para evitar la oxidación de la luteína. Después de secado, esto produce un producto similar a polvo de tamaño de partícula pequeño.

El polvo así obtenido luego se puede utilizar directamente o en una mezcla con otros ingredientes como un aditivo para comida de peces por motivos de coloración o en aplicaciones alimenticias como complementos dietéticos. En otro proceso, se puede concentrar la luteína mediante un proceso de extracción que incluye extracción con solventes supercríticos para utilizarlos para la formulación de complemento alimenticio o productos farmacéuticos.

10 Aplicación industrial

De acuerdo con la enseñanza de la presente invención, se ha encontrado que ciertas cepas de algas mutantes exhiben una productividad sorprendentemente alta para la producción de luteína, especialmente si se cultiva bajo condiciones optimizadas. Por lo tanto, otro objeto de la presente invención se dirige al uso de las algas verdes seleccionadas de un grupo de cepas mutantes de *Chlorella sorokiniana* (SAG 211-32) identificadas por las referencias de depósito CCAP

(i) CCAP 211-93,

(ii) CCAP 211-94,

(iii) CCAP 211-95, y

(iv) CCAP 211-96

20 para la producción de luteína o producto enriquecido con luteína.

EJEMPLOS

1. Organismo y condiciones de cultivo

Se obtiene *Chlorella sorokiniana* SAG 211-32 de la Colección de Cultivo de la Universidad Göttingen (Alemania). Se hacen crecer células fotoautotóricamente al burbujear a través de la suspensión celular aire complementado con 1 % (v/v) de CO₂ como la única fuente de carbono, excepto en los experimentos para estudiar el crecimiento mixotrófico, en el que el medio se complementa con acetato de sodio 20-60 mM y/o glucosa 100 mM. Se utiliza medio de cultivo de Arnon et al. (1974) modificado para contener 4 mM K₂HPO₄ y 20 mM NaNO₃, excepto cuando se indica. Las células se hacen crecer en cultivo en lotes a 28° C (excepto en los experimentos dirigidos a estudiar el efecto de la temperatura), en matraces Roux de 1 L de capacidad, lateralmente y continuamente iluminado con lámparas de haluro de mercurio a 460 μmol fotones m⁻² s⁻¹ (excepto cuando se indica) medido en las superficies de los matraces utilizando un sensor LI-COR quantum (modelo L1-1905B, Lic-Cor, Inc. Lincoln, NE, USA) conectado en un fotómetro quantum.

2. Mutagenia y selección de mutantes que producen súper luteína

Las células en la fase de crecimiento logarítmica (10⁶ células mL⁻¹) se cosechan mediante centrifugación (2,700 x g, 10 min), se lavan con agua estéril y se tratan con 0.1 mg mL⁻¹ de N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (NNG) (5-10 % de supervivencia) durante 1 h. Las células tratadas se lavan con agua estéril, se resuspenden en medio modificado Arnon y se incuban bajo luz tenue durante 24 h. Las células se rocían en medio modificado Arnon sólido que contiene, 4 μM norflurazón o 400 μM nicotina y se incuban a 25 °C y 60 μmol de fotones m⁻² s⁻¹ durante 3-4 semanas. Las colonias de resistencia a herbicida se subcultivan varias veces, descargando aquellas que muestran crecimiento lento. Los mutantes preseleccionados se hacen crecer en erlenmeyers de 100 ml de capacidad bajo condiciones fotoautotóricas sin acetato y glucosa, se agitan a 100 rpm y se iluminan desde la parte superior de 50 μmol fotones m⁻² s⁻¹ para analizar el contenido de carotenoides y el crecimiento.

3. Análisis

Para análisis de carotenoides, se extraen pigmentos con metanol a 70 °C, se centrifugan, el sobrenadante se evapora bajo N₂ y el glóbulo se re-suspende en metanol (Del Campo et al. 2001), se centrifuga y se analiza mediante HPLC utilizando una columna de cartucho Waters Spherisorb S5 ODS1 (4.6 x 250 mm). Se utiliza el

método cromatográfico descrito por Baroli et al. (2003). Los pigmentos se eluyen en un índice de flujo de 1.2 ml/min con un gradiente lineal de 100 % de solvente A (acetonitrilo: metanol: 0.1 mM Tris-HCl, pH 8.0 [84:2:14]) a 100 % de solvente B (metanol: acetato de etilo [68:32]) durante 15 min, seguido por 3 min de solvente B. Se detectan carotenoides a 440 nm utilizando un detector de disposición de yoduro de cesio Waters 2996. Para la determinación de peso seco (DW) se filtran 5 ml de alícuotas del cultivo celular a través de papel Whatman GF/C, se lavan tres veces, y los filtros que contienen las algas se secan a 80 °C durante 24 h. Se llevan a cabo análisis en triplicado independientes para cada muestra, los resultados representan los valores medios.

4. Determinación del índice de crecimiento específico máximo y producción máxima de luteína

Se calcula el índice de crecimiento específico máximo (μ_{max}) del peso seco medido, durante la fase logarítmica de crecimiento, utilizando la ecuación:

$$\mu_{max} = (\ln x_2 - \ln x_1) / (t_2 - t_1)$$

en donde x_2 y x_1 representan valores de peso seco en términos de $g L^{-1}$ en los tiempos t_2 y t_1 , respectivamente. Se calcula la productividad máxima de luteína al multiplicar μ_{max} y el contenido máximo de luteína en la fase exponencial ($mg L^{-1}$).

Solo se analizan colonias resistentes al crecimiento en contenido de luteína. Para la evaluación de la producción de luteína mediante los mutantes obtenidos hacemos crecer los mutantes y la cepa natural correspondiente en cultivos líquidos con agitación (90 rpm), partiendo de la misma densidad celular (5×10^4 células/ml). Las células se iluminan en una irradiación de $60 \mu E m^{-2} s^{-1}$. Se muestra en la Tabla 1 la producción volumétrica de luteína, el contenido de luteína por peso seco de los cultivos de los mejores mutantes, así como también el crecimiento en términos de peso seco de las cepas naturales y los mejores mutantes:

Tabla 1

Análisis comparativo de crecimiento y contenidos en peso seco y volumétrico de luteína de mutantes y cepas tipo natural (WT) de <i>Chlorella sorokiniana</i> SAG 211-32 en cultivos líquidos						
Cepa	Fase de desaceleración media			Fase de desaceleración final		
	Peso seco ($g L^{-1}$)	luteína ($mg L^{-1}$)	luteína ($mg g^{-1} DW$)	Peso seco ($g L^{-1}$)	luteína ($mg L^{-1}$)	luteína ($mg g^{-1} DW$)
Ejemplo 1						
WT	0.96±0.02	1.76±0.12	1.85±0.24	1.09±0.08	4.00±0.58	3.65±0.30
B7 (NIC)	0.82±0.09	2.17±0.21	2.68±0.33	0.95±0.05	4.09±0.25	4.30±0.06
B8 (NIC)	0.88±0.18	2.21±0.27	2.55±0.25	1.12±0.16	4.68±0.76	4.19±0.07
Ejemplo 2						
WT	0.53±0.02	2.10±0.10	3.96±0.21	1.25±0.09	4.63±0.15	3.70±0.23
K-35 (NF)	0.52±0.10	2.45±0.06	4.79±0.76	1.21±0.03	5.82±0.25	4.82±0.37
Ejemplo 3						
WT	0.69±0.02	2.61±0.21	3.76±0.24	0.88±0.07	4.27±0.45	4.84±0.23
K-54 (NF)	0.76±0.01	3.53±0.11	4.64±0.23	1.01±0.05	6.00±0.57	5.94±0.15
Ejemplo 4						
WT	0.51±0.10	1.75±0.06	3.57±0.57	0.94±0.06	3.57±0.58	3.79±0.33
MR-3 (NF)	0.58±0.04	1.81±0.22	3.18±0.80	1.23±0.08	5.40±0.01	4.43±0.28
MR-14 (NIC)	0.52±0.07	1.63±0.21	3.14±0.02	1.19±0.01	5.80±0.56	4.89±0.50
MR-15 (NIC)	0.64±0.00	2.03±0.16	3.17±0.25	1.08±0.09	5.16±0.46	4.77±0.03
MR-16 (NIC)	0.73±0.06	2.27±0.11	3.16±0.54	1.33±0.03	7.18±1.02	5.38±0.91

(continuación)

Análisis comparativo de crecimiento y contenidos en peso seco y volumétrico de luteína de mutantes y cepas tipo natural (WT) de <i>Chlorella sorokiniana</i> SAG 211-32 en cultivos líquidos						
Cepa	Fase de desaceleración media			Fase de desaceleración final		
	Peso seco (g L ⁻¹)	luteína (mg L ⁻¹)	luteína (mg g ⁻¹ DW)	Peso seco (g L ⁻¹)	luteína (mg L ⁻¹)	luteína (mg g ⁻¹ DW)
Ejemplo 5						
WT	0.48±0.06	1.54±0.11	3.21±0.22	0.88±0.03	3.76±0.57	4.24±0.48
DMR-1 (NIC)	0.38±0.01	1.53±0.03	4.01±0.07	0.90±0.02	5.33±0.08	5.92±0.02
DMR-4 (NIC)	0.49±0.05	2.09±0.14	4.25±0.13	1.04±0.01	6.10±0.40	5.87±0.44
DMR-11 (NIC)	0.40±0.01	1.73±0.03	4.39±0.07	0.89±0.01	5.60±0.10	6.32±0.20
Ejemplo 6						
WT	0.54±0.04	1.75±0.10	3.28±0.21	0.88±0.05	3.99±0.42	4.51±0.26
DMR-5 (NF)	0.50±0.06	2.08±0.23	4.16±0.01	0.76±0.11	5.13±0.23	6.97±1.31
DMR-8 (NF)	0.50±0.01	1.93±0.08	3.90±0.10	0.74±0.03	5.13±0.08	6.92±0.22
DMR-11 (NF)	0.47±0.02	2.08±0.03	4.46±0.13	0.97±0.00	5.38±0.03	5.57±0.03
Ejemplo 7						
WT	0.54±0.04	1.89±0.12	4.43±0.43	0.93±0.04	4.38±0.22	4.72±0.17
DMR-17(NF)	0.55±0.03	2.40±0.10	4.43±0.43	0.91±0.06	5.23±0.13	5.79±0.25
DMR-22 (NF)	0.61±0.01	2.40±0.15	3.93±0.30	0.94±0.04	5.30±0.15	5.63±0.08
Ejemplo 8						
WT	0.56±0.08	2.33±0.13	4.24±0.35	0.86±0.01	4.15±0.10	4.88±0.06
DMR-37 (NF)	0.68±0.03	2.95±0.15	4.34±0.03	0.96±0.07	5.53±0.38	5.76±0.03
DMR-39 (NF)	0.62±0.02	2.95±0.00	4.65±0.03	0.92±0.04	5.15±0.00	5.64±0.22

Se hacen crecer células a $60 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Todos los datos representan valores medios de \pm DE de por lo menos 3 mediciones independientes.

- 5 Se prueban diversos mutantes resistentes a norflurazón (NF) o nicotina (NIC) y cuatro especies seleccionadas sobre la base de crecimiento y contenido de luteína.

- El mutante resistente a norflurazón K-54 (CCAP 211/93) exhibe 41% de producción volumétrica aumentada de luteína al final de la fase de desaceleración;
- El mutante resistente a la nicotina B-7 (CCAP 211/94) aumenta el peso seco del contenido de luteína mediante 45% en la mitad de la fase de desaceleración en comparación con la cepa natural;
- 10 ○El mutante resistente a la nicotina DMR-4 (CCAP 211/95) exhibe un aumento en la producción volumétrica de luteína de 36% y en peso seco del contenido de luteína de 32% en la mitad de la fase de desaceleración y de 62% y 38%, respectivamente al final de la fase de desaceleración, cuando se compara con la cepa tipo natural;
- 15 ○El mejor mutante MR-16 (CCAP 211/96), resistente a la nicotina, exhibe un aumento en la producción volumétrica de luteína de 106% (dos veces cuando se compara con el tipo natural) y en contenido en peso seco de luteína de 42% al final de la fase de desaceleración cuando se compara con la cepa tipo natural.

Los cuatro mutantes se han depositado en CCAP. Los números de registro se dan anteriormente en paréntesis. Es importante bosquejar que el contenido de luteína por peso seco obtiene valores de 5.4 mg g^{-1} de peso seco⁻¹ (MR-16)

y 5.9 mg g de peso seco⁻¹ (DMR-4), que son muy altos. Se presenta en la Tabla 2 el aumento de la producción de luteína comparado con los tipos naturales.

Tabla 2

Aumento (%) en contenidos volumétricos de luteína y peso seco con relación al tipo natural en cultivos líquidos.				
Cepa	Fase de desaceleración media		Fase de desaceleración final	
	Contenido de luteína		Contenido de luteína	
	Volumétrico (mg L ⁻¹)	Peso seco (mg g ⁻¹ DW)	Volumétrico (mg L ⁻¹)	Peso seco (mg g ⁻¹ DW)
B7 (NIC)	23	45	2	18
B8 (NIC)	26	38	17	15
K-35 (NF)	17	21	26	30
K-54 (NF)	35	23	41	23
MR-3 (NF)	3	-11	52	17
MR-14 (NIC)	-7	-12	63	29
MR-15 (NIC)	16	-12	45	26
MR-16 (NIC)	29	-11	106	42
DMR-1 (NIC)	-1	25	42	40
DMR-4 (NIC)	36	32	62	38
DMR-11 (NIC)	12	37	49	49
DMR-5 (NF)	19	27	29	55
DMR-8 (NF)	10	19	29	53
DMR-11 (NF)	19	36	35	23
DMR-17 (NF)	27	0	19	23
DMR-22 (NF)	27	-11	21	19
DMR-37 (NF)	27	2	33	18
DMR-39 (NF)	27	10	24	16

- 5 Es evidente que hemos obtenido los mejores mutantes que vienen de la selección con base en resistencia a la nicotina. Analizando los datos de todos los mutantes hemos observado una correlación muy significativa entre el índice de crecimiento de las algas y la producción volumétrica de luteína o aún frecuentemente el contenido de peso seco de luteína. Es importante destacar que estos mutantes exhiben mejor crecimiento o crecimiento similar (peso seco) que la cepa natural, que es importante para usos prácticos (productividad). Esta correlación se puede utilizar como un criterio para la preselección de mutantes de superproducción de luteína.
- 10

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para obtener luteína a partir de algas, caracterizado porque
- (a) se cultivan algas verdes seleccionadas de un grupo de cepas mutantes de *Chlorella sorokiniana* (SAG 211-32) identificadas por las referencias de depósito CCAP
- 5 (i) CCAP 211-93,
(ii) CCAP 211-94,
(iii) CCAP 211-95, y
(iv) CCAP 211-96
- para producir luteína hasta que se logra un contenido deseado del antioxidante,
- 10 (b) las algas se cosechan y se utilizan como un producto y/o
- (c) el contenido de luteína se separa del resto de la biomasa.
2. Proceso de acuerdo con la Reivindicación 1, caracterizado porque se utilizan cepas mutantes obtenidas de *Chlorella sorokiniana* después de tratamiento con N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina (NG).
3. Proceso de acuerdo con las Reivindicaciones 1 y/o 2, caracterizado porque el cultivo de las algas se realiza a una
- 15 temperatura de 20 a 40 °C.
4. Proceso de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones precedentes 1 a 3, caracterizado porque el cultivo se realiza utilizando un medio de cultivo mixotrófico.
5. Proceso de acuerdo con la Reivindicación 4, caracterizado porque se utiliza un medio de cultivo, que comprende nitratos 10 a 60 mM y sales de ácido acético 20 a 60 mM.
- 20 6. Proceso de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones precedentes 1 a 5, caracterizado porque el cultivo se realiza bajo una irradiación de luz de 500-1,000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.
7. Proceso de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones precedentes 1 a 6, caracterizado porque el cultivo se realiza bajo tensión.
8. Proceso de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones precedentes 1 a 7 caracterizado porque el cultivo se
- 25 realiza en un fotobiorreactor.
9. Proceso de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones precedentes 1 a 8 caracterizado porque las células cultivadas en la etapa (b) se recolectan para formar una suspensión concentrada, se agregan opcionalmente anti-oxidantes y emulsificantes a dicha suspensión, y las células recolectadas se interrumpen opcionalmente y se secan para obtener una luteína o un producto enriquecido con luteína.
- 30 10. Uso de las algas verdes seleccionadas de un grupo de cepas mutantes de *Chlorella sorokiniana* (SAG 211-32) identificadas por las referencias de depósito CCAP
- (i) CCAP 211-93,
(ii) CCAP 211-94,
(iii) CCAP 211-95, y
- 35 (iv) CCAP 211-96
- para la producción de luteína o producto enriquecido con luteína.