

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 652 607**

51 Int. Cl.:

C12N 1/06 (2006.01)

C12N 1/12 (2006.01)

C12N 9/20 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

C12P 23/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.01.2012 PCT/EP2012/000004**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.07.2012 WO12089842**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.01.2012 E 12703432 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2658960**

54 Título: **Procesos de producción mejorados de componentes celulares de Haematococcus**

30 Prioridad:

31.12.2010 US 201061428943 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.02.2018

73 Titular/es:

**DIREVO INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY GMBH
(100.0%)
Nattermannallee 1
50829 Köln, DE**

72 Inventor/es:

**MILOS, KLAUDIJA;
STAMME, CLAUDIA;
WIENAND, TANJA;
SVETLICHNY, VITALY y
SCHEIDIG, ANDREAS**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 652 607 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

Procesos de producción mejorados de componentes celulares de *Haematococcus*

Campo de la descripción

- 5 La tecnología descrita en la presente se refiere a nuevos métodos y composiciones para los procesos de producción de componentes celulares algales procedentes de algas del género *Haematococcus*. La extractabilidad de los componentes celulares algales se mejora y el proceso se optimiza y se acelera empleando las composiciones de enzimas según la presente invención.

Antecedentes

- 10 En general, las algas se agrupan en dos categorías, microalgas y macroalgas, basándose en su morfología y tamaño. Tal como indica el nombre, las microalgas son organismos fotosintéticos microscópicos, muchos de los cuales son unicelulares. Por el contrario, las macroalgas, que se conocen habitualmente como algas marinas, están compuestas de múltiples células que se organizan en estructuras que se parecen a las raíces, los tallos y las hojas de las plantas superiores.

- 15 Se cree que las microalgas son una de las primeras formas de vida sobre la tierra y son las plantas de crecimiento más rápido del mundo. Puesto que son capaces de habitar en hábitats ecológicos diversos, que varían desde agua dulce, agua salobre o agua salada, están equipadas para crecer en diversas condiciones extremas de temperatura y pH. Estas peculiaridades hacen que las microalgas sean los organismos más abundantes sobre la tierra.

- 20 La macroalgas en general, tales como *Laminaria*, *Saccorhiza*, *Alaria*, pertenecen al grupo de las algas marrones y crecen hasta una altura de metros, y su principal material de reserva alimentaria es la laminarina y el manitol. La algas rojas, tales como *Gelidium amansii*, que están compuestas de celulosa, glucano y galactano, también pueden ser materias primas potenciales para la bioconversión en etanol.

- 25 Además, la algas producen sustancias bioquímicas exclusivas que pueden ser farmacológicamente activas, por ejemplo, como inhibidores víricos o inhibidores de la división celular, y sustancias que pueden actuar como agentes gelificantes y espesantes y que se emplean, por ejemplo, en la industria alimentaria. Por ejemplo, pueden producirse carotenoides, tales como la astaxantina, empleada como antioxidante en nutrición humana, en algas verdes, tales como *Haematococcus pluvialis*. Del gran número de especies marinas y de agua dulce conocidas, solo unas pocas tienen importancia comercial en la actualidad. Estas incluyen *Chlorella*, *Spirulina*, *Dunaliella* y *Haematococcus*.

- 30 El cultivo es la forma principal para generar biomasa a partir de microalgas. Esto se ha realizado a escala industrial durante muchos años. Los sistemas de producción más habituales empleados para el cultivo de algas son los estanques a cielo abierto y los fotobiorreactores ("photobioreactor", PBR) cubiertos. Los sistemas de producción varían en términos del control de los parámetros de crecimiento, la contaminación, la evaporación del agua, la productividad, las características del procesamiento corriente abajo, el capital y los costes operativos, etc.

- 35 La recolección produce un material en suspensión con una concentración de algas del 2-7%. La siguiente etapa es la eliminación del agua para obtener una concentración del 15 al 25%. Esto se logra habitualmente mediante compresión o centrifugación. Estas etapas normalmente se integran en la operación de recolección. En algunas aplicaciones puede ser necesario un secado. Una cuestión muy importante en el tratamiento de la biomasa es la conservación de la calidad química.

- 40 La recuperación de la biomasa de microalgas que requiere, en general, una o más etapas de separación de sólidos-líquidos es una fase difícil en el proceso de producción de biomasa algal y puede suponer 20-30% de los costes totales de producción. Los procesos implicados incluyen floculación, filtración, flotación y sedimentación centrífuga, algunos de los cuales consumen mucha energía. En general, la recolección de microalgas es un proceso en dos etapas que implica: (1) Una recolección bruta dirigida a la separación de la biomasa de la suspensión bruta. Los factores de concentración para esta operación son en general de 100-800 veces para alcanzar 2-7% de materia sólida total. Esto dependerá de la concentración inicial de biomasa y de las tecnologías empleadas, que incluyen la floculación, la flotación o la sedimentación por gravedad. (2) Espesamiento, cuyo objetivo es concentrar la suspensión mediante técnicas tales como la centrifugación, la filtración y la agregación ultrasónica y, por tanto, es una etapa que, en general, consume más energía que la recolección bruta.

- 45 La suspensión de biomasa recolectada (generalmente 5-15% de contenido en sólidos secos) es perecedera y debe procesarse con rapidez después de la recolección; a menudo se emplea una deshidratación o un secado para extender la viabilidad, dependiendo del producto final requerido. Los métodos que se han empleado incluyen el secado al sol, el secado en bandejas a baja presión, el secado por pulverización, el secado con tambor, el secado con un lecho fluido y la liofilización. El secado por pulverización se emplea habitualmente para la extracción de productos de alto valor, pero es relativamente caro y puede provocar un deterioro significativo en algunos pigmentos algales. La liofilización es igualmente cara, en especial para operaciones a gran escala, pero facilita la extracción de los aceites. Los elementos intracelulares, tales como los aceites, resultan difíciles de extraer con disolventes de la biomasa húmeda sin que se rompan las células, pero se extraen con más facilidad a partir de biomasa liofilizada. El

coste del secado es una consideración importante en el procesamiento de polvo de biomasa de microalgas para la industria alimentaria y de piensos y, en especial, para la industria emergente de biocombustibles.

A menudo es necesaria la ruptura de las células para recuperar los productos intracelulares de microalgas y se realiza para liberar los productos intracelulares hacia el caldo de cultivo, haciendo que estén disponibles para posteriores procesos de separación. Los métodos de ruptura celular que se han empleado con éxito incluyen molienda con bolas, homogeneizadores de alta presión, autoclave, extracción de CO₂ supercrítica ultrasónica y adición de ácido clorhídrico, hidróxido de sodio o lisis alcalina. Los disolventes, tales como, por ejemplo, hexano, se emplean mucho para extraer metabolitos, tales como la astaxantina, el beta-caroteno y los ácidos grasos de la biomasa algal. Las propiedades de la membrana celular desempeñan un papel importante en el proceso de extracción con disolventes. Por ejemplo, la presencia de una pared celular puede evitar el contacto directo entre el disolvente y la membrana celular e impide la extracción.

Uno de los desafíos clave sigue siendo el desarrollo de tecnologías de extracción acuosa, puesto que las células algales varían mucho en su composición entre las especies.

Haematococcus pluvialis es una especie de agua dulce de Chlorophyta que pertenece a la familia Haematococcaceae. Esta especie es muy conocida por su alto contenido en el antioxidante fuerte astaxantina, que es importante en la acuicultura, diversos productos farmacéuticos y cosméticos. Una alta cantidad de astaxantina está presente en las células en reposo, que es producida y rápidamente acumulada cuando las condiciones ambientales se convierten en desfavorables para el crecimiento celular normal. El proceso de producción comercial se basa en dos etapas de cultivo diferenciadas. La primera se denomina "etapa verde" ("Green Stage") que comienza en un espacio cerrado con colonias de una sola célula del microalga, y continúa en espacio abierto en fotobiorreactores alimentados con energía solar. El objetivo de esta etapa es producir muchas células algales "verdes" viables no estresadas mediante el proceso de división celular normal. La "etapa verde" proporciona condiciones de crecimiento óptimas para lograr la máxima tasa de producción de biomasa. La segunda etapa de cultivo es la "etapa roja" ("Red Stage"), en la cual las células algales sintetizan y acumulan el pigmento astaxantina. Esta etapa comienza sometiendo las células a condiciones severas de estrés, principalmente una alta intensidad de radiación y cambios en el medio de crecimiento. Como resultado, las células de *Haematococcus* comienzan a formar cistos mediante la producción de paredes celulares espesas, y a sintetizar y acumular astaxantina en su forma esterificada.

El cultivo de algas en sistemas cerrados permite un proceso controlado desde el punto de vista ambiental, con menos contaminación biológica y química. Tras el proceso "rojo", el nivel de astaxantina en las "células rojas" puede alcanzar hasta aproximadamente 4% de su peso seco. El contenido en astaxantina de las "células rojas" se correlaciona con la gravedad de las condiciones de estrés, principalmente con el flujo de luz a través del cultivo. A su debido tiempo, el cultivo "rojo" se bombea hacia el área de procesamiento posterior, en donde las células se rompen (para que el pigmento esté biodisponible), se secan y se envasan al vacío. En una etapa adicional se produce la oleorresina de *Haematococcus* empleando procesos de extracción de fluido supercrítico de CO₂. Tanto los consumidores como las agentes reguladoras requieren cada vez con más frecuencia extractos que no contengan disolventes residuales. U.S. Nutra of Eustis, FL, tiene la tecnología para extraer *Haematococcus* sin CO₂ y sin ningún codisolvente.

Sin embargo, la degradación enzimática de la pared celular no se aplica en gran medida en la industria de la astaxantina, principalmente porque las enzimas de lisis celular tradicionalmente han sido muy caras y las paredes celulares de los cistos de *Haematococcus* son conocidos por su resistencia a la degradación. Sin embargo, las enzimas de la técnica anterior no mantienen algunas de las ventajas significativas de otros métodos de ruptura de células algales, tales como su selectividad de degradación. La selectividad de las enzimas es importante para la extracción de productos químicos delicados y marginalmente estables. Las paredes celulares de *Haematococcus* son más recalcitrantes que las paredes celulares de otras algas. La mayoría de las paredes celulares de microalgas contienen celulosa, pero *Haematococcus* tiene envueltas trilaminares ("tri-laminar sheaths", TLS) adicionales que contienen algenano, una sustancia conocida por su resistencia a la degradación (Allard *et al.*, 2002; Versteegh y Blokker, 2004). Tal como se mencionó anteriormente, las paredes celulares de los cistos de *Haematococcus* son muy resistentes a la degradación.

Por ejemplo, el documento WO 2010/104922 A1 describe el uso de una composición de enzimas que comprende una lipasa, una celulasa y/o una proteasa para el acondicionamiento de una biomasa de algas en un método de extracción de astaxantina.

Además, los documentos US 5.795.764, WO 2009/033071 A2 y WO 2010/149859 A2 describen el uso de mananasa para degradar un material algal para mejorar la extracción de componentes.

El documento KR 2009 0131991 describe un proceso para extraer astaxantina a partir de *H. pluvialis* empleando beta-glucanasa.

Sin embargo, la degradación de estos biopolímeros empleando métodos mecánicos requiere un exceso de utilización de energía y múltiples pasos a través del equipo de ruptura en un molino de bolas.

Por tanto, son necesarios nuevos métodos de producción de componentes celulares de algas pertenecientes al género *Haematococcus* y nuevos métodos para mejorar la extractabilidad de estos componentes celulares.

Sumario de la descripción

- 5 La presente invención se define según las reivindicaciones y se refiere a un método para mejorar la extractabilidad de la astaxantina en forma del isómero (3S,3'S) a partir de una biomasa de algas, que comprende las etapas de: a) someter la biomasa de algas a una composición de enzimas que comprende una mananasa, una laminarinasa y una lipasa; b) extraer la astaxantina en forma del isómero (3S,3'S) a partir de la biomasa de algas, en el que el alga pertenece a la especie *Haematococcus pluvialis*.
- 10 En otro aspecto, la presente descripción se refiere a métodos para mejorar la extractabilidad de un componente celular de algas a partir de una biomasa de algas, que comprenden las etapas de:
- a) someter la biomasa de algas a una composición de enzimas que comprende una mananasa y/o una lipasa y/o una laminarinasa,
- b) extraer la composición celular de la biomasa de algas,
- en los que las algas pertenecen al género *Haematococcus*.
- 15 En un segundo aspecto, la descripción se refiere a métodos para producir un componente celular de algas empleando algas que pertenecen al género *Haematococcus*, que comprenden las etapas de:
- a) cultivar las algas en un medio líquido,
- b) recolectar las algas,
- c) romper las células de algas mediante un tratamiento enzimático con composición de enzimas que comprende una mananasa y/o una lipasa y/o una laminarinasa,
- 20 d) aislar el componente celular.
- En un tercer aspecto, la presente descripción se refiere a métodos para producir un carotenoide empleando un alga fotoautótrofa que pertenece a la especie *Haematococcus pluvialis* capaz de producir una cantidad eficaz de un carotenoide, que comprenden las etapas de:
- 25 (a) cultivar las células de algas bajo condiciones fotoautótrofas en un medio líquido,
- (b) recolectar las células de algas,
- (c) centrifugar las células recolectadas para la eliminación del agua,
- (d) realizar un tratamiento enzimático de las células de algas, o de partes de estas, con una composición de enzimas que comprende una mananasa y/o una lipasa y/o una laminarinasa,
- 30 (e) aislar el carotenoide del medio mediante extracción y/o mediante centrifugación.
- En otro aspecto, la presente descripción se refiere a los usos de composiciones de enzimas que comprenden una mananasa, preferiblemente una 1,4-beta-mananasa, más preferiblemente una endo-1,4-beta-mananasa para la extracción de astaxantina a partir de *Haematococcus pluvialis*.
- 35 Además, la presente descripción se refiere al uso de una composición de enzimas que comprende una lipasa para la extracción de astaxantina a partir de *Haematococcus pluvialis*.
- Además, la presente descripción se refiere al uso de una composición de enzimas que comprende una laminarinasa para la extracción de astaxantina a partir de *Haematococcus pluvialis*, y al uso de una mananasa, una lipasa y/o una laminarinasa, o sus mezclas, para la extracción de astaxantina a partir de *Haematococcus pluvialis*.

Breve descripción de los dibujos

- 40 La figura 1 muestra los resultados del tratamiento de *Haematococcus pluvialis* con diferentes composiciones de enzimas.
- La figura 2 muestra los resultados del tratamiento de *Haematococcus pluvialis* con una composición de enzima que tiene actividad mananasa.
- La figura 3 muestra el proceso de producción y las etapas de extracción generales de microalgas.
- 45 La figura 4 es un diagrama de flujo del proceso de procesar células de *Haematococcus pluvialis* para la extracción

de astaxantina.

La figura 5 es un diagrama que muestra el efecto de la enzima mananasa sobre la ruptura de células y la extracción de carotenoides de *Haematococcus pluvialis*.

Descripción detallada de la descripción

- 5 Las enzimas de la presente invención pueden utilizarse para mejorar la extractabilidad de una composición celular de algas a partir de células de algas que pertenecen al género *Haematococcus*. La recuperación de carotenoides, tales como astaxantina, a partir de hematocistos de pared celular dura de *Haematococcus* es uno de los objetos de la presente descripción.
- 10 Las realizaciones de la presente invención están relacionadas con métodos para producir un componente celular de células de algas, por ejemplo, componentes celulares naturales, tales como pigmentos o lípidos, así como productos producidos por las células de algas, por ejemplo, después de una modificación genética de las células. Los métodos según la presente descripción pueden ser métodos para producir carotenoides, biocombustibles o productos de aceites, así como la producción de componentes farmacéuticos activos.
- 15 Por ejemplo, en algunas realizaciones, las enzimas según la presente descripción pueden añadirse a células algales suspendidas en disoluciones para degradar las paredes celulares algales y liberar su contenido, mientras que, en algunas realizaciones, pueden introducirse moléculas de ácidos nucleicos que codifican dichas enzimas en las células algales para que expresen allí la enzimas, de modo que estas enzimas puedan degradar las paredes celulares algales y/o las paredes celulares de los cistos de algas desde el interior.
- 20 En algunas realizaciones, pueden introducirse ácidos nucleicos que codifican enzimas capaces de catalizar la degradación de células de algas en las células de algas para que expresen las enzimas dentro de estas células y degraden sus paredes celulares, mientras que también pueden añadirse enzimas a las células o mezclarse con las células para estimular aún más la degradación celular.
- 25 Una ventaja de los métodos y las composiciones de enzimas según la presente descripción es que, después de la degradación enzimática de las células de algas, ya no son necesarios otros métodos de degradación de células mediante un tratamiento químico y/o físico o estos pueden reducirse a un mínimo de tiempo.
- Sin embargo, en algunas realizaciones, los métodos según la presente descripción comprenden una etapa de tratamiento no enzimático adicional, tal como calentamiento, sonicación, lisis mecánica, choque osmótico, expresión de un gen de autólisis, exposición a un pH mayor que 8 y exposición a un pH menor que 6.
- 30 En la presente se describen métodos para mejorar la extractabilidad de componentes celulares de algas empleando enzimas y/o mezclas de enzimas según la presente descripción. En algunas realizaciones, los métodos para mejorar la extractabilidad de una composición celular de algas según la presente descripción comprenden las siguientes etapas:
 - a) cultivar y hacer crecer células de algas hasta una biomasa de algas deseada,
 - 35 b) someter la biomasa de algas a una composición de enzimas que comprende una o más enzimas capaces de degradar las células de algas,
 - c) extraer la composición celular de la biomasa de algas.
- En realizaciones ventajosas, la presente descripción se refiere a métodos para producir un componente celular de algas que comprenden las etapas de:
 - a) cultivar y hacer crecer algas en un medio líquido hasta una biomasa de algas deseada,
 - 40 b) recolectar las algas,
 - c) realizar un tratamiento enzimático de las algas con una composición de enzimas que comprende una mananasa y una lipasa,
 - d) aislar el componente celular de la biomasa de algas.
- 45 En algunas realizaciones, la composición celular puede estar formada por pigmentos, tales como carotenoides, carbohidratos, tales como almidón, lípidos, tales como ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), proteínas, aminoácidos, vitaminas y nutrientes minerales. En una realización ventajosa, la composición celular es un carotenoide, tal como astaxantina. En otra realización de la descripción, las clorofilas y los carotenoides se aíslan de los lípidos neutros.
- 50 En una realización ventajosa, la composición celular está formada por un carotenoide. Tal como se emplea en la presente, el término "carotenoide" significa el propio compuesto químico, así como un pigmento del tinte apropiado,

a menos que se indique lo contrario. Por ejemplo, en el caso de la astaxantina, esto significa el compuesto químico 3,3'-dihidroxi-beta,beta-caroteno-4,4'-diona en forma del isómero (3S,3'S), así como el tinte como pigmento. Los carotenoides son compuestos solubles en lípidos coloreados que pueden encontrarse en plantas superiores y algas, así como en organismos no fotosintéticos, tales como animales (aunque estos no son capaces de sintetizar carotenoides), hongos y bacterias. Los carotenoides son responsables de los colores rojo, naranja y amarillo de las hojas, frutos y flores de las plantas, así como del color de las plumas, conchas de crustáceos, piel y carne de peces, etc. (Gudin, 2003; Johnson y Schroeder, 1995; Negro y Garrido-Fernández, 2000). La estructura química de más de 600 carotenoides diferentes se deriva de una cadena de polieno de 40 carbonos que puede considerarse como el esqueleto de la molécula. El sistema de polieno otorga a los carotenoides su estructura molecular diferenciada, sus propiedades químicas y sus características de absorción de luz. Esta cadena puede estar terminada por grupos cíclicos (anillos) y puede complementarse con grupos funcionales que contienen oxígeno. Los carotenoides de hidrocarburos se denominan carotenos, mientras que los derivados oxigenados se conocen como xantofilas. En estas últimas, el oxígeno puede estar presente como grupos OH (tal como en la luteína), como grupos oxi (tal como en la cantaxantina), o en una combinación de ambos (tal como en la astaxantina; Higuera-Ciapara *et al.*, 2006).

Tal como se ha mencionado, la molécula de astaxantina presenta dos carbonos asimétricos localizados en las posiciones 3 y 3' de los anillos de bencenoides en cualquiera de los extremos de la molécula. Se producen diferentes enantiómeros de la molécula según la forma exacta en que estos grupos hidroxilo (-OH) se unen a los átomos de carbono en estos centros de asimetría (figura 1). Si el grupo hidroxilo está unido de modo que se proyecta por encima del plano de la molécula, se dice que está en la configuración R, y cuando el grupo hidroxilo está unido de modo que se proyecta por debajo del plano de la molécula, se dice que está en la configuración S. Así, los tres posibles enantiómeros se denominan R,R', S,S' y R,S' (meso). En una realización ventajosa, el carotenoide producido/extraído es la astaxantina en forma del isómero (3S,3'S).

La astaxantina libre es la forma en la cual los grupos hidroxilo 3 y 3' no están unidos, un monoéster de astaxantina tiene un ácido graso unido en una posición 3, y un diéster de astaxantina tiene un ácido graso unido a cada una de las posiciones 3. La astaxantina libre y sus mono- y diésteres, por ejemplo, de las algas del género *Haematococcus* tienen una quiralidad (3S,3'S) ópticamente pura (Renstrom *et al.*, 1981). Los monoésteres y diésteres son relativamente no polares, mientras que los carotenoides libres son relativamente polares. La fracción de carotenoides de las algas de *Haematococcus* contiene aproximadamente 70% de monoésteres de astaxantina, 10% de diésteres de astaxantina, 5% de astaxantina libre, siendo el resto β -caroteno, cantaxantina, y luteína.

En una primera etapa, las algas se cultivan y se hacen crecer en un medio líquido hasta una biomasa de algas deseada. Las algas se cultivan para la producción de una composición celular (por ejemplo, lípidos, ácidos grasos, aldehídos, alcoholes, alcanos, carotenoides, etc.). Este tipo de cultivo se realiza a pequeña escala y, al menos inicialmente, bajo condiciones en las que el microorganismo de partida puede crecer. Por ejemplo, si el microorganismo de partida es un fotoautótrofo, el cultivo inicial se realiza en presencia de luz. Las condiciones de cultivo pueden cambiar si el microorganismo evoluciona o se modifica para que crezca de modo independiente de la luz. Las algas pueden cultivarse en biorreactores o estanques.

Las microalgas, en particular las microalgas del género *Haematococcus*, son caras de producir, aunque se están realizando muchos esfuerzos para lograr un modo barato de cultivo en masa de estos organismos. Se han diseñado diferentes sistemas para el crecimiento y la manipulación de microalgas a gran escala (Borowitzka, 1999; Gudin y Chaumont, 1980; Molina-Grima *et al.*, 1999; Pulz, 2001; Richmond, 2004; Tredici, 2004; Weissman *et al.*, 1988). Dentro de los sistemas abiertos, la mejor elección parece ser el estanque somero al aire libre, formado por canales nivelados con una anchura de 2-10 m y una profundidad de 15-30 cm, que se extienden como curvas sencillas o como sistemas de meandros. Cada unidad cubre un área de varios cientos a unos pocos miles de metros cuadrados. Habitualmente, la turbulencia la proporcionan ruedas de paletas rotatorias, que crean un flujo de suspensiones algales a lo largo de los canales a una velocidad de 0,2-0,5 m s⁻¹.

Las algas según la presente descripción son algas verdes del género *Haematococcus*, en particular algas de las especies *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*), *Haematococcus lacustris* (*H. lacustris*), *Haematococcus capensis* (*H. capensis*), *Haematococcus droebakensis* (*H. droebakensis*), y *Haematococcus zimbabwiensis* (*H. zimbabwiensis*). En una realización ventajosa, las algas son de la especie *Haematococcus pluvialis*.

En la presente descripción, se emplean las algas verdes descritas anteriormente que contienen astaxantina. Cuando las algas verdes se someten a estreses del entorno, tales como la privación de nutrientes o la presencia de óxidos, las algas verdes acumulan astaxantina dentro de las células y se convierten en esporas en reposo. El desplazamiento a este estado de reposo se denomina enquistamiento. En esta memoria descriptiva, el enquistamiento se refiere a cualquier estado desde el inicio del estado de reposo, cuando empieza la acumulación de astaxantina, hasta el estado completamente enquistado, en el que las células se convierten en esporas en reposo. Para aumentar el contenido en astaxantina, es preferible emplear algas verdes en las que el enquistamiento ha avanzado lo más posible y que han acumulado una gran cantidad de astaxantina. Debe advertirse que el "cultivo de algas verdes enquistadas", tal como se emplea en la presente, también incluye el proceso de inocular algas verdes que contienen astaxantina que se han hecho crecer en un medio nutriente, después de que las algas hayan alcanzado el estado enquistado. En la presente memoria descriptiva, se pretende que las "algas verdes" también incluyan las algas verdes enquistadas.

Los cultivos de *Haematococcus* son muy sensibles a la contaminación por otros microorganismos, así como a condiciones ambientales extremas (temperatura alta y baja, y luz fuerte y débil). Los hematocistos de *Haematococcus* contienen 1,5-3% de la biomasa seca después de esta fase de enrojecimiento. La recolección de *Haematococcus* puede realizarse mediante una sedimentación y posterior centrifugación, puesto que los hematocistos, grandes y pegajosos, sedimentan con facilidad. Después, esta biomasa puede secarse y romperse para fracturar la pared celular dura y espesa de los cistos, asegurando así una máxima biodisponibilidad. Esta etapa de ruptura es una de las objeciones de la presente descripción.

No existe ninguna limitación concreta acerca del medio utilizado para cultivar las algas verdes. En general, se emplea un medio que contiene nitrógeno, sales inorgánicas de metales traza (por ejemplo, fósforo, potasio, magnesio y hierro), vitaminas (por ejemplo, tiamina), y similares, que son esenciales para el crecimiento. Por ejemplo, pueden emplearse medios tales como el medio VT, el medio C, el medio MC, el medio MBM, y el medio MDM (véase Sorui Kenkyuho, ed. por Mitsuo Chihara y Kazutoshi Nishizawa, Kyoritsu Shuppan (1979)), el medio OHM (véase Fábregas *et al.*, J. Biotech., vol. 89, pp. 65-71 (2001)), el medio BG-11, y sus modificaciones. En la presente invención, es preferible emplear un medio autótrofo que esté sustancialmente exento de una fuente de carbono orgánica, de modo que pueda evitarse la contaminación por bacterias.

Estos medios pueden seleccionarse dependiendo de sus objetivos, tales como el crecimiento o el enquistamiento. Por ejemplo, para el crecimiento de algas verdes, se emplea un medio que contiene una gran cantidad de componentes que actúan como fuente de nitrógeno (medio rico: contiene al menos 0,15 g/l expresados en términos de nitrógeno). Para el enquistamiento, se emplea un medio que contiene una pequeña cantidad de componentes que actúan como fuente de nitrógeno (medio de enquistamiento: contiene menos de 0,02 g/l expresados en términos de nitrógeno). Como alternativa, puede emplearse un medio que contenga una fuente de nitrógeno a una concentración intermedia entre estos medios (medio con baja cantidad de nutrientes: contiene al menos 0,02 g/l y menos de 0,15 g/l expresados en términos de nitrógeno).

La concentración de la fuente de nitrógeno, la concentración de fósforo y otras propiedades del medio pueden determinarse dependiendo de la cantidad de algas verdes que se van a inocular. Por ejemplo, cuando un recuento de algas verdes del orden de 10^5 se va a inocular en un medio con bajo contenido en nutrientes, las algas verdes crecerán hasta cierto punto, pero el crecimiento puede detenerse pronto debido a que la cantidad de la fuente de nitrógeno es demasiado pequeña. Este medio con baja cantidad en nutrientes resulta adecuado para realizar el crecimiento y el enquistamiento continuamente en una única etapa (de una manera discontinua), tal como se describe a continuación. Además, mediante el ajuste de la proporción molar N/P a un valor de 10 a 30, preferiblemente de 15 a 25, las algas verdes pueden enquistarse.

No existe ninguna limitación particular acerca del aparato para cultivar las algas verdes, con la condición de que el aparato sea capaz de suministrar dióxido de carbono y de irradiar luz a una suspensión de cultivo. Por ejemplo, en el caso de un cultivo a pequeña escala, puede emplearse preferiblemente un matraz de cultivo plano. En el caso de un cultivo a gran escala, puede utilizarse un tanque de cultivo que esté constituido por una placa transparente fabricada de vidrio, plástico o similares, y que esté equipado con un aparato de irradiación y un agitador, si es necesario. Los ejemplos de dichos tanques de cultivo incluyen un tanque de cultivo de placa, un tanque de cultivo de tipo tubular, un tanque de cultivo de tipo de cúpula de aireación, y un tanque de cultivo de tipo cilindro hueco. Sin embargo, también pueden emplearse estanques abiertos o cerrados para cultivar las algas, y agua de mar como medio de cultivo natural.

No existe ninguna limitación concreta acerca de las condiciones de cultivo y puede emplearse una temperatura, un pH y similares, iguales a los que se emplean en general para el cultivo de algas. Las algas verdes se cultivan, por ejemplo, de 15 a 35 °C, y preferiblemente de 20 a 25 °C. Resulta preferible que el pH se mantenga de 6 a 8 a lo largo del periodo de cultivo. El dióxido de carbono se suministra burbujeando un gas que contiene dióxido de carbono a una concentración del 1 al 3% en v/v a una velocidad de 0,2 a 2 wm, por ejemplo. Cuando se emplea un tanque de cultivo de placa, la suspensión de cultivo se agita suministrando el dióxido de carbono, de modo que las algas verdes pueden irradiarse con luz de modo uniforme.

En el caso en que el recuento de algas verdes para la inoculación es aún mayor, puede emplearse el medio rico para realizar el cultivo descrito anteriormente.

De esta manera, la composición del medio puede determinarse tomando en cuenta diversas condiciones. Debe advertirse que el medio preferiblemente empleado en la presente invención, es decir, un medio autótrofo, está casi exento de una fuente de carbono orgánica, tal como ácido acético o glucosa, de modo que la contaminación por bacterias apenas ocurre incluso en un cultivo a largo plazo.

En una segunda etapa, las células de algas se recolectan y opcionalmente se centrifugan para reducir el contenido en agua. La biomasa recolectada puede trasladarse a un tanque de tampón (véase la figura 4). En una realización ventajosa, la biomasa de algas después se trata con una composición de enzimas.

En una realización ventajosa de la presente descripción, la composición de enzimas comprende una hemicelulasa. Una "hemicelulasa" se refiere a una proteína que cataliza la hidrólisis de hemicelulosa, tal como la que se encuentra

en materiales lignocelulósicos. La hemicelulosa es un polímero complejo, y su composición a menudo varía ampliamente de un organismo a otro y de un tipo de tejido a otro. Las hemicelulosas incluyen una diversidad de compuestos, tales como xilanos, arabinoxilanos, xiloglucanos, mananos, glucomananos, y galactomananos. La hemicelulosa también puede contener glucano, que es un término general para los restos glucosa beta-enlazados.

En general, un componente principal de la hemicelulosa es la xilosa beta-1,4-enlazada, un azúcar de cinco carbonos. Sin embargo, esta xilosa a menudo está ramificada con enlaces beta-1,3 o enlaces beta-1,2, y puede estar sustituida con enlaces a arabinosa, galactosa, manosa, ácido glucurónico, o mediante esterificación con el ácido acético. La composición, la naturaleza de la sustitución y el grado de ramificación de la hemicelulosa es muy diferente en plantas dicotiledóneas (es decir, plantas cuyas semillas tienen dos cotiledones u hojas de la semilla, tales como judía de Lima, cacahuetes, almendras, guisantes, alubias), comparado con las plantas monocotiledóneas (es decir, plantas que tienen un único cotiledón u hoja de la semilla, tales como maíz, trigo, arroz, gramíneas, cebada). En las dicotiledóneas, la hemicelulosa está compuesta principalmente de xiloglucanos, que son cadenas de glucosa 1,4-beta-enlazadas con cadenas laterales de xilosilo 1,6-alfa-enlazadas. En las monocotiledóneas, que incluyen la mayoría de los cultivos de grano, los principales componentes de la hemicelulosa son los heteroxilanos. Están formados principalmente de polímeros de esqueleto de xilosa 1,4-beta-enlazados con enlaces 1,2- o 1,3-beta a la arabinosa, la galactosa y la manosa, así como xilosa modificada con ácido acético con enlace éster. También están presentes beta-glucanos ramificados formados por cadenas de glucosilo 1,3- y 1,4- beta-enlazadas. En las monocotiledóneas, la celulosa, los heteroxilanos y beta-glucanos están presentes aproximadamente en cantidades iguales, y cada uno comprende aproximadamente 15-25% de la materia seca de las paredes celulares. Las enzimas hemicelulolíticas, concretamente, las hemicelulasas, incluyen enzimas de acción en endo y de acción en exo, tales como xilanasas, [beta]-xilosidasas, galactanasas, [alfa]-galactosidasas, [beta]-galactosidasas, endoarabinasas, arabinofuranosidasas, mananasas, [beta]-manosidasas. Las hemicelulasas también incluyen enzimas accesorias, tales como acetilsterasas, ácido ferúlico esterasas, y ácido cumárico esterasas. Entre estas, las xilanasas y las acetil xilano esterasas rompen el xilano y las cadenas laterales de acetilo del xilano, estando el resto de los xilo-oligómeros sin sustituir y, por tanto, pueden hidrolizarse solo con [beta]-xilosidasa. Además, se han descubierto varias actividades secundarias menos conocidas en preparaciones de enzimas que hidrolizan la hemicelulosa. Por consiguiente, las xilanasas, las acetilsterasas y las [beta]-xilosidasas son ejemplos de hemicelulasas.

En una realización ventajosa de la presente descripción, la composición de enzimas comprende una mananasa o uno de sus equivalentes funcionales. El término "mananasa" se refiere a cualquier enzima capaz de hidrolizar cadenas de poliosa que están compuestas de unidades de manosa (manopolímeros o polimanosas). Por tanto, "mananasa" comprende las endomananasas y las exomananasas que rompen los manopolímeros internamente o desde los extremos terminales del polímero, respectivamente. En realizaciones ventajosas se emplea una 1,4-beta-mananasa, preferiblemente una mananasa con actividad principal endo-1,4-beta-mananasa.

La endo- β -1,4-D-mananasa (β -mananasa; EC 3.2.1.78) cataliza la hidrólisis aleatoria de enlaces mano-glicosídicos en polisacáridos con una base de manano. La mayoría de las β -mananasas degradan oligosacáridos hasta DP4 (Biely y Tenkanen (1998), *Enzymology of hemicellulose degradation*, pp. 25-47, en Harman y Kubicek (ed.), *Trichoderma and Gliocladium*, vol. 2, Taylor and Francis Ltd., Londres), aunque se ha demostrado una actividad residual sobre manotriosa, lo cual indica que existen al menos cuatro subsitios para la unión a manosa sobre la proteína. Los principales productos finales de la hidrólisis son a menudo manobiosa y manotriosa, aunque también se producen cantidades significativas de manosa. Algunas β -mananasas son capaces de degradar el manano cristalino. Además de la hidrólisis, varias β -mananasas, que incluyen la β -mananasa de *Trichoderma reesei*, han demostrado formar productos de transglicosilación con manosa o manobiosa como aceptor de enlaces glicosídicos.

Las β -mananasas se han aislado a partir de una amplia gama de organismos, que incluyen bacterias, hongos, plantas y animales. Aunque en su mayor parte son extracelulares, algunas β -mananasas parecen estar asociadas a células. Su expresión a menudo es inducida por el crecimiento sobre manano o galactomanano, aunque la β -mananasa de *T. reesei* también puede ser inducida por celulosa, mientras que su expresión es suprimida por glucosa y otros monosacáridos. Con frecuencia aparecen múltiples mananasas con diferentes puntos isoeléctricos en el mismo organismo, que representan productos de diferentes genes o productos diferentes del mismo gen, respectivamente.

En una realización de la presente descripción, la composición de enzimas muestra la actividad de la enzima mananasa como actividad principal. En este caso, aunque la composición de enzimas comprende otras enzimas que la mananasa o uno de sus equivalentes funcionales, la actividad mananasa es la actividad principal en la mezcla de enzimas. Por ejemplo, si la composición de enzimas comprende una mananasa y una celulasa, la celulasa muestra solo una actividad secundaria en la mezcla de enzimas y puede considerarse como una contaminación de la composición de enzimas. En otras palabras, en una realización ventajosa de la descripción, la composición de enzimas muestra solo una pequeña actividad celulasa y una alta actividad mananasa.

En otra realización ventajosa de la descripción, la composición de enzimas comprende otra enzima capaz de degradar células de algas, en particular seleccionada del grupo que consiste, pero no se limita a otras hemicelulasas, alfa-galactosidasas, beta-galactosidasas, lactasas, laminarinasa, glucanasas, beta-glucanasas, endo-beta-1,4-glucanasas, celulasas, xilosidasas, xilanasas, xiloglucanasas, xilano acetil esterasas, galactanasas, exomananasas, pectinasas, pectina liasas, pectinesterasas, poligalacturonasas, arabinasas, ramnogalacturonasas, lacasas, reductasas, oxidasas, fenoloxidasas, ligninasas, proteasas, amilasas, fosfatasa, enzimas lipolíticas,

esterasas, cutinasas y/u otras. En una realización ventajosa, la glucanasa es una endo-1,3(4)-beta-glucanasa.

En una realización preferida, la composición de enzimas comprende una laminarinasa. La laminarinasa es capaz de hidrolizar la laminarina o calosa. Hasta la fecha, se han identificado la endo- β -1,3(4)-glucanasa (EC 3.2.1.6) y la endo- β -1,3-glucanasa (EC 3.2.1.39); la endo- β -1,3(4)-glucanasa (EC 3.2.1.6) es capaz de hidrolizar los enlaces β -1,3- y -1,4-glicosídicos, mientras que la endo- β -1,3-glucanasa (EC 3.2.1.39) es capaz de hidrolizar principalmente los enlaces β -1,3-glicosídicos (Boeckmann *et al.*, 2003; Terra y Ferreira, 1994). La laminarinasa también actúa de modo sinérgico con celulasas, tales como endo- β -1,4-glucanasa, para hidrolizar polisacáridos estructurales dentro de la pared celular de plantas (Mansfield *et al.*, 1999).

En una realización preferida, la composición de enzimas comprende una lipasa. Una lipasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces éster en sustratos lipídicos hidrofóbicos. Las lipasas catalizan la hidrólisis de lípidos en glicerol y ácidos grasos.

En otra realización, la composición de enzimas comprende al menos otra enzima, además de las enzimas mencionadas anteriormente, tales como una proteasa, celulasa, pectinasa y/o una glucanasa, o sus mezclas. En una realización, la glucanasa es una endo-1,3(4)-beta-glucanasa.

Una "pectinasa" según la presente descripción se refiere a enzimas, tales como pectinilasa, pectinesterasas y poligalacturonasa y sus combinaciones, que degradan la pectina.

Una "proteasa" según la presente descripción es cualquier enzima que realiza la proteólisis, es decir, da comienzo al catabolismo de proteínas mediante la hidrólisis de los enlaces peptídicos que conectan a los aminoácidos entre sí en la cadena polipeptídica que forma la proteína.

Una "celulasa" según la presente descripción es cualquier enzima que cataliza la celulólisis (es decir, la hidrólisis) de la celulosa.

En una realización ventajosa de la descripción, la composición de enzimas comprende una mananasa como actividad principal. En otra realización de la descripción, la composición de enzimas comprende una lipasa como actividad principal. En otra realización ventajosa, la composición de enzimas comprende una laminarinasa y/o una 1,3(4)-beta-glucanasa como actividad principal.

En una realización ventajosa de la descripción, la composición de enzimas comprende una mananasa y una lipasa como actividades principales. En otra realización ventajosa de la descripción, la composición de enzimas comprende una mananasa, una lipasa y una celulasa como actividades principales. En otra realización ventajosa de la descripción, la composición de enzimas comprende una mananasa y una proteasa o/y una mananasa y una celulasa como actividades principales. En otra realización ventajosa de la descripción, la composición de enzimas comprende una mananasa, una laminarinasa y una lipasa como actividades principales. En otra realización ventajosa de la descripción, la composición de enzimas comprende una mananasa, una lipasa, una laminarinasa y/o una 1,3(4)-beta-glucanasa como actividades principales. En otra realización ventajosa, la composición de enzimas comprende una mananasa, una proteasa y una celulasa como actividades principales. En otra realización ventajosa, la composición de enzimas comprende una mananasa, una pectinasa y una celulasa como actividades principales. En otra realización ventajosa, la composición de enzimas comprende una lipasa y una laminarinasa y/o una 1,3(4)-beta-glucanasa como actividades principales. En otra realización ventajosa, la composición de enzimas comprende una mananasa y una laminarinasa y/o una 1,3(4)-beta-glucanasa como actividades principales.

La combinación de enzimas comprendida en la composición de enzimas para extraer astaxantina de microalgas, tales como algas verdes, preferiblemente de algas verdes enquistadas, preferiblemente del género *Haematococcus* y preferiblemente de *Haematococcus pluvialis*, es la combinación de una mananasa, una pectinasa y una celulasa, preferiblemente la combinación de una mananasa, una laminarinasa y una lipasa, más preferiblemente la combinación de una mananasa y una lipasa.

En otro aspecto, la descripción se refiere a métodos para producir un componente celular de algas, en particular un carotenoide, empleando algas que pertenecen al género *Haematococcus*, que comprenden las etapas de:

a) cultivar las algas en un medio líquido,

b) recolectar las algas,

c) realizar un tratamiento enzimático de las células de algas, o de partes de estas, con una composición de enzimas que comprende una mananasa y/o una lipasa y/o una laminarinasa,

d) aislar el componente celular.

Tal como se emplea en la presente, el término "aislamiento", tal como se emplea en la presente descripción, se refiere a un proceso o medio que es adecuado para obtener un componente de células de algas a partir de las algas que se han roto, tal como extracción o centrifugación. El aislamiento del componente de células de algas para su posterior uso o análisis también puede realizarse mediante procedimientos de extracción conocidos. En particular,

las células puede recolectarse mediante centrifugación, por ejemplo, a 1900 x g durante 3 minutos, y lavarse una o dos veces en agua. El sedimento celular que se obtiene mediante centrifugación se tritura con un mortero y una mano de mortero con la ayuda de polvo de aluminio, y después se resuspende en un disolvente orgánico adecuado, por ejemplo en acetona o metanol, y el extracto de carotenoides se separa de los residuos celulares mediante centrifugación a 1900 x g, se saponifica con una mezcla de los mismos volúmenes de una disolución al 2% (en p/v) de KOH en metanol y éter dietílico, después el sobrenadante se evapora bajo una atmósfera de N₂ y el sedimento se resuspende en acetona, se centrifuga y se analiza mediante HPLC. El proceso se realiza a una temperatura de entre 0 °C y 40 °C, en particular entre 5 °C y 35 °C, más en particular entre 10 °C y 30 °C, preferiblemente a temperatura ambiente, preferiblemente en la oscuridad, y el extracto de carotenoides se mantiene a una temperatura de entre -20 °C y 25 °C, más en particular entre -20 °C y 4 °C, preferiblemente a -20 °C. Opcionalmente, las muestras obtenidas pueden recolectarse y centrifugarse una vez más para separar las partículas no deseadas de las células o extractos. El sobrenadante puede utilizarse para otros análisis espectrofotométricos, tal como se mencionó anteriormente, para una HPLC u otras tecnologías relativas al análisis de carotenoides o células que los contienen, tales como cromatografía en capa fina, por ejemplo, empleando placas de gel Kiesel, cromatografía de gases o cromatografía de resonancia magnética.

En general, un componente de células de algas, en particular un carotenoide producido con un método según la presente descripción, puede aislarse y/o extraerse mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los carotenoides pueden aislarse mediante extracción del microorganismo, o de partes de este, tales como los residuos celulares o células físicamente prensadas, empleando un disolvente orgánico tal como se mencionó anteriormente.

Con respecto al análisis mediante HPLC, puede emplearse una HPLC en fase inversa según procedimientos conocidos. En particular, puede utilizarse una columna de cartucho Waters Spherisorb S5 ODS 18 4,6 x 250 mm y un gradiente lineal de disolvente desde 100% de disolvente A (acetonitrilo:metanol:Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 [84:2:14]) hasta 100% de disolvente B (metanol:acetato de etilo [68:32]) durante 15 min, seguido de 3 min de disolvente B, que se bombea empleando un sistema Dual Dispensity con un caudal de 1,2 ml min⁻¹ a partir de lo cual pueden eluirse los pigmentos carotenoides. Los pigmentos pueden detectarse empleando un detector de matriz de fotodiodos (Waters 2996) a 440 nm. La concentración de los carotenoides individuales se determina empleando curvas patrón de pigmentos purificados a concentraciones conocidas. La astaxantina también puede determinarse midiendo la absorbancia a 477 nm empleando un coeficiente de extinción de 2100. A partir de la bibliografía, se sabe que el carotenoide obtenido, la astaxantina, puede lograrse en la forma pura del isómero (3S,3'S).

En algunas realizaciones, los métodos según la presente descripción comprenden una etapa de tratamiento no enzimático adicional, seleccionada del grupo que consiste en calentamiento, sonicación, lisis mecánica, choque osmótico, expresión de un gen de autólisis, exposición a un pH mayor que 8 y exposición a un pH menor que 6. En particular, la ruptura de las paredes celulares de las algas puede realizarse de modo adecuado mediante uno o más métodos dentro del grupo que consiste en ultrasonificación, ruptura por cizallamiento en líquido, molienda con bolas, compresión a alta presión, liofilización, compresión en estado congelado, hidrolización y degradación con virus.

En una realización ventajosa, la etapa de tratamiento no enzimático es una lisis mecánica, preferiblemente molienda, en particular molienda con bolas o esferas.

Esta etapa de tratamiento no enzimático puede realizarse antes y/o después del tratamiento enzimático. En algunas realizaciones, la etapa de tratamiento no enzimático se realiza antes de la etapa del tratamiento enzimático para romper las paredes celulares de las algas. El siguiente tratamiento enzimático de la biomasa de algas tratadas de modo no enzimático que comprende células de algas que no están rotas, partes de las células de algas, tales como compartimentos y/o paredes celulares, con una composición de enzimas según la presente descripción aumenta el rendimiento de los componentes celulares deseados, tales como los carotenoides. En una realización, se obtiene un aumento del 8% en el rendimiento de carotenoides de *Haematococcus pluvialis* después de una extracción con acetona. En otras realizaciones, la etapa de tratamiento no enzimático se realiza después de la etapa de tratamiento enzimático. El tratamiento enzimático con una composición de enzimas según la presente descripción rompe las paredes celulares de las algas, y la posterior lisis mecánica que consume energía, por ejemplo, mediante molienda, puede reducirse significativamente en tiempo.

El uso de las composiciones de enzimas según la presente descripción muestra un efecto claro sobre la ruptura de células de algas en ensayos a escala de laboratorio, así como a escala piloto. El uso produce una disminución significativa del tiempo de procesamiento. Además, aumenta el rendimiento del componente celular de las algas producido.

Por tanto, las enzimas y las composiciones de enzimas de la presente descripción pueden utilizarse para mejorar la liberación de los contenidos de una célula de alga. En algunas realizaciones, el contacto o el mezclado de las células de algas con las enzimas de la presente descripción degrada las paredes celulares, lo cual produce la lisis celular y la liberación del contenido celular. Por ejemplo, las enzimas de la presente descripción pueden utilizarse para degradar las paredes celulares de células de micro- y macroalgas para liberar los materiales contenidos dentro de las células de algas. En algunas realizaciones, estos materiales pueden incluir, sin limitación, carotenoides, alcoholes y aceites. Los alcoholes y los aceites liberados de esta forma pueden procesarse después para producir biocombustible, combustible para aviones, así como otros bioproductos importantes económicamente.

Las enzimas y las composiciones de enzimas de la presente descripción pueden utilizarse solas o en combinación con otras enzimas, productos químicos o biológicos. Las enzimas de la presente descripción pueden emplearse para aplicaciones *in vitro*, en las que las enzimas, o sus mezclas, se añaden o se mezclan con los sustratos apropiados para catalizar las reacciones deseadas.

- 5 Además, las enzimas de la presente descripción pueden emplearse para aplicaciones *in vivo*, en las que se introducen moléculas de ácidos nucleicos que codifican las enzimas en las células algales y expresarse allí para producir las enzimas y catalizar las reacciones deseadas dentro de las células.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, pueden añadirse enzimas capaces de estimular la degradación de la pared celular a células algales suspendidas en disoluciones para degradar las paredes celulares algales y liberar su contenido, mientras que en algunas realizaciones, pueden introducirse moléculas de ácidos nucleicos que codifican dichas enzimas en las células algales para que expresen allí la enzimas, de modo que estas enzimas pueden degradar las paredes celulares algales desde el interior. Algunas realizaciones pueden combinar las aplicaciones *in vitro* con las aplicaciones *in vivo*. Por ejemplo, pueden introducirse ácidos nucleicos que codifican enzimas capaces de catalizar la degradación de la pared celular en las células de algas para que expresen las enzimas dentro de estas células y degraden sus paredes celulares, mientras que también pueden añadirse enzimas a las células o mezclarse con las células para estimular aún más la degradación de la pared celular. En algunas realizaciones, las enzimas empleadas para aplicaciones *in vitro* pueden ser diferentes de las enzimas empleadas para aplicaciones *in vivo*. Por ejemplo, una enzima con actividad mananasa puede mezclarse con las células, mientras que una enzima con actividad proteasa se expresa dentro de las células.

20 En un aspecto, la presente descripción incluye proteínas aisladas o derivadas del conocimiento de enzimas de un hongo filamentosos, tal como *Aspergillus*, *Trichoderma* o uno de sus mutantes u otro derivado. Por ejemplo, si un hongo filamentosos se cultiva sobre una especie de alga, las proteínas, preferiblemente las proteínas con actividad enzimática, del hongo filamentosos pueden aislarse y emplearse para la degradación de la misma especie de alga en un proceso de producción.

25 La figura 1 muestra un ejemplo del uso de diferentes composiciones de enzimas según la presente descripción para la extracción de carotenoides como componente celular típico. Las composiciones de enzimas comprenden una o más de las siguientes enzimas disponibles en el mercado:

- a) RGMP = Rohalase GMP de AB Enzymes (comprende actividad mananasa como actividad principal)
- b) L34P = Lipomod 34P de Biocatalysts, Ltd. (comprende actividad lipasa/esterasa como actividad principal)
- 30 c) C13P = Cellulase 13P de Biocatalysts Ltd. (comprende actividad celulasa como actividad principal)

El tratamiento de la biomasa de algas con las composiciones de enzimas muestra una mejor extracción de carotenoides (en porcentaje), en contraste con el lote control en el cual no se añadió enzima a las algas.

La figura 2 también muestra la mejor extracción de carotenoides como componente celular típico después de moler la biomasa de algas tratada con mananasa. Después del tratamiento de la biomasa de algas con las mananasas, se reduce el posterior tiempo de molienda para extraer los carotenoides. La enzima se añade después de que las células de algas se hayan cultivado y hayan crecido para producir la biomasa de algas deseada y haber sido recolectadas mediante centrifugación. Después de someter la biomasa de algas a la composición de enzimas, la biomasa se muele para extraer los carotenoides.

40 Sin embargo, en otros ejemplos se ha demostrado que no fueron necesarios otros métodos de ruptura de células después del tratamiento de la biomasa de algas con las composiciones de enzimas según la presente descripción.

Los métodos según la presente descripción también pueden utilizarse en la producción de biocombustibles, tales como biodiesel y bioetanol y/o en la producción de piensos animales.

La extracción de lípidos de algas para la producción de biocombustibles de algas es un ejemplo del uso de los métodos de extracción según la presente descripción. Además, la degradación enzimática de las paredes celulares de las algas aumenta la disponibilidad de proteínas y aminoácidos, lípidos tales como PUFA y/o carotenoides tales como astaxantina, cuando se emplean como pienso animal. Debido a alta tasa de extracción cuando se emplean los métodos según la presente descripción, la biomasa de algas puede utilizarse como alternativa a la harina de pescado en acuicultura-

50 A menos que se indique lo contrario, todos los términos y expresiones técnicos y científicos empleados en la presente tienen el mismo significado que el que entienden habitualmente los expertos en la técnica a la cual pertenece esta descripción. Singleton, *et al.*, DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 20 ed., John Wiley and Sons, Nueva York (1994), y Hale y Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991) proporcionan a los expertos en la técnica un diccionario general de muchos de los términos y expresiones empleados en esta descripción.

Los encabezamientos proporcionados en la presente no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de esta descripción, y pueden leerse como referencia a la memoria descriptiva como un todo. Por consiguiente, los términos y las expresiones definidos inmediatamente a continuación se definen con más precisión haciendo referencia a la memoria descriptiva como un todo.

- 5 Los siguientes métodos y ejemplos se ofrecen solo con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente descripción de ninguna manera.

Métodos y ejemplos

- 10 En los siguientes ejemplos, se proporcionan materiales y métodos de la presente descripción. Debe entenderse que estos ejemplos solo tienen un fin ilustrativo y no deben considerarse limitantes de esta descripción de ninguna manera.

Ejemplo 1: Efecto de diferentes enzimas sobre la extracción de carotenoides de *Haematococcus pluvialis*

Las algas se cultivaron en matraces de agitación de 10 l y se separaron empleando una centrifuga.

Se realizaron las siguientes etapas para medir la tasa de extracción de los carotenoides después del tratamiento enzimático:

- 15 Suspensión de algas: al 10% NaCl al 0,9%

Enzima: al 10% NaCl al 0,9%

Disolución de enzimas: NaCl al 0,9%

Lote: 500 µl de algas + 1/100 (5 µl)

- 20 Incubación de la enzima: durante la noche (aproximadamente 20 h) de duración a una temperatura de 35 °C con agitación a 500 rpm, seguido de molienda, extracción y medición espectrométrica

Molienda (molino Retsch-Mill)

Volumen: 500 µl

Esferas de vidrio: 250 mg

Duración de la molienda: 2x y 4x 30 min

- 25 Frecuencia: 20 Hz

Extracción

Volumen total antes de la extracción: 100 µl

Medio de extracción: acetona

Medio de extracción añadido: 900 µl, correlación en % al 90%

- 30 Centrifugación: 2 min 2000 x g

Medición

Dilución a medición: 1 a 25 con acetona

Longitud de onda: 474 nm

Analizador: Tecan MI 000

- 35 Placa de superficie: Eppendorf PP

Controles

"no tratado"

"molido"

- 40 Comparado con las células de algas sin tratar, el grado de ruptura celular aumentó significativamente empleando la composición de enzimas según la presente descripción (véase la tabla 1, figura 1).

Tabla 1

	inicio	2x 30 min, 20 Hz	4x 30 min, 20 Hz	
RGMP	18%	65%	74%	
RGMP + L34P	18%	58%	85%	
RGMP + C13P	18%	72%	72%	
RGMP + L34P + C13'	18%	83%	86%	
sin enzima	18%	33%	44%	
c. molidas				100%

Ejemplo 2: Extracción de carotenoides de *Haematococcus pluvialis*

5 Se realizaron las siguientes etapas para medir la tasa de extracción de los carotenoides después del tratamiento enzimático:

- 10 l de suspensión de *Haematococcus* con células de algas al 6,6% (dm)
- Enzima añadida: 50 g de RGMP en 10 l de suspensión de algas al 0,5% (en p/v)
- Preincubación con enzima durante 2 horas
- Molienda en un molino Netzsch Mill LME4 con una capacidad de procesamiento de 150 l/h

10 - Tomar muestras de las algas tratadas con enzimas cada 30 minutos

El grado de células que se han roto se midió mediante extracción con acetona al 90%, tal como se describió en el ejemplo 1.

Comparado con las células de algas sin tratar, el grado de ruptura celular aumentó significativamente empleando la composición de enzimas según la presente descripción (véase la tabla 2, figura 2).

15 Tabla 2

h	Con enzima	% de ruptura de células
0	-	-
0,5	0,37	34%
1,0	0,64	58%
1,5	0,76	68%
2,0	0,84	76%
2,5	0,94	85%
3,0	0,97	88%
3,5	1,03	94%
4,0	1,06	96%
h	Sin enzima	% de ruptura de células
-	0,00	0%
1,5	0,42	38%
3	0,66	60%
4	0,68	62%
	max	
	1,10	100%

Ejemplo 3: Efecto de la laminarinasa y la lipasa para mejorar la extracción de carotenoides de *Haematococcus pluvialis*

Tabla 3

Endo-1,4- β -mananasa	Dilución antes de la aplicación: 1:2 en agua	Endo-1,4- β -mananasa (<i>Bacillus</i> sp.) Megazyme, n.º de catálogo: E-BMABS
Laminarinasa	Dilución antes de la aplicación: 5,64 mg/ml en agua	Laminarinasa de <i>Trichoderma</i> sp., Sigma-Aldrich (n.º de catálogo: L5272)
Lipasa de <i>Rhizopus niveaus</i>	Dilución antes de la aplicación: 50 mg/ml en agua	Lipasa de <i>Rhizopus niveaus</i> Sigma-Aldrich (n.º de catálogo: 62310)

- 5 Se mezclaron 20 ml de una suspensión acuosa de algas (al 10-12,5% peso seco) con 10 ml de esferas de vidrio (diámetro de 0,3 mm) en un matraz de agitación, seguido de la adición de 5 ml de la disolución de enzimas o agua en el caso del blanco. La incubación con enzimas se realizó a 50 °C durante 60 minutos en un agitador rotatorio a 120 rpm. Las muestras se liofilizaron durante la noche y se determinó la materia seca después de secar a 105 °C durante 24 h. Se determinaron los carotenoides y la astaxantina extraíbles totales mediante extracción con acetona
- 10 siguiendo los protocolos de Cyanotech o Fuji Chemicals.

Procedimiento de extracción Cyanotech:

El protocolo se realizó a baja temperatura y luz débil, puesto que los carotenoides son muy sensibles a la luz, el oxígeno y el calor. Se recomienda realizar el ensayo en una habitación a oscuras, manteniendo la temperatura a 5 °C si es posible.

- 15 1) Pesar aproximadamente 25 mg de polvo seco de algas *Haematococcus*, en un tubo de centrifuga de 10 ml.
- 2) Añadir 3 gramos de esferas de vidrio a los tubos.
- 3) Añadir 5 ml de DMSO a los tubos de centrifuga, colocar en un baño de agua precalentada a 45-50 °C durante 30 minutos. Agitar en vórtice durante 15 segundos cada 10 minutos durante la incubación.
- 4) Centrifugar a 3800-4200 rpm durante 5 minutos para sedimentar el material celular.
- 20 5) Pipetear el sobrenadante y recogerlo en un matraz volumétrico de 25 ml.
- 6) Añadir 5 ml de acetona al tubo de centrifuga, agitar en vórtice vigorosamente durante 30 segundos. Centrifugar los tubos a 3500 rpm durante 5 minutos para sedimentar el material celular. Trasladar el sobrenadante a los matraces volumétricos.
- 7) Si el sobrenadante todavía estaba coloreado, repetir la etapa 6 hasta que la capa de acetona centrifugada tenga una absorbancia menor que 0,05.
- 25 8) Después todo el sobrenadante se recoge en el matraz volumétrico y se lleva el volumen a 25 ml con acetona.
- 9) Cerrar el matraz e invertirlo suavemente para mezclar. Pipetear una parte alícuota (5-7 ml) hacia un tubo limpio y centrifugar durante 5 minutos a 3500 rpm para eliminar cualquier materia en partículas que haya podido venir con las transferencias.
- 30 10) Leer la absorbancia máxima (aproximadamente 471-477 nm) frente al blanco de acetona en el espectrofotómetro.
- 11) Si la absorbancia es mayor que 1,25 es necesario diluir la muestra con acetona y ajustar el cálculo para la dilución (las lecturas de absorbancia son lineales entre 0,25 y 1,25). Una dilución 1:7 (1 parte de extracto de astaxantina a 6 partes de acetona) generalmente ajusta la absorbancia final dentro del intervalo apropiado.
- 35 12) Ir a la parte 2 para la hidrólisis de los ésteres de carotenoides.

Tabla 4

Enzima	% de astaxantina extraída
Sin enzima	1,004
β -mananasa	1,310
Laminarinasa	1,124
Lipasa de <i>Rhizopus niveaus</i>	1,156

5 Las enzimas mencionadas en la tabla 3 se añadieron a la biomasa de algas. Los resultados se muestran en la tabla 4. Debido al tratamiento con la beta-1,4-mananasa, la mejora en la extractabilidad de *Haematococcus pluvialis* aumenta significativamente. La aplicación de la laminarinasa y la lipasa también mejora la extractabilidad.

En un segundo ensayo, las enzimas se emplearon en combinación y los resultados aparecen en la tabla 5. La combinación de mananasa con laminarinasa y lipasa mejora la extractabilidad considerablemente más cuando se compara con el tratamiento solo con mananasa.

Tabla 5

Enzima	% de astaxantina extraída
β -mananasa/laminarinasa	1,25
β -mananasa/lipasa de <i>Rhizopus niveaus</i>	1,25
Laminarinasa/lipasa de <i>Rhizopus niveaus</i>	1,21
β -mananasa/laminarinasa/lipasa de <i>Rhizopus niveaus</i>	1,43

Ejemplo 4: Efecto de las enzimas de mananasa sobre la rotura de células de *Haematococcus pluvialis*

15 Se incubaron 20 ml de algas con 12% de materia seca en un matraz de agitación que contenía esferas de vidrio con 5 ml de una disolución acuosa de enzimas. La incubación se realizó a 50 °C durante 1 h en un agitador de incubación (300 ppm). Después de la incubación se midió la concentración de carotenoides extraíbles mediante una extracción con acetona según un protocolo estándar de Cyanotech o Fuji Chemicals (véase el ejemplo 3).

Se emplearon diferentes composiciones de enzimas (producto 1-4) para los ensayos. Las actividades de la enzima mananasa aplicada por 25 ml de volumen de muestra fueron como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 6

	Mananasa, U/25 ml
Producto 1	585
Producto 2	44
Producto 3	314
Producto 4	854

20 La actividad enzimática se determinó empleando un ensayo DNSA:

Sustrato para el ensayo de mananasa: galactomanano de algarroba

Se disolvieron los sustratos en tampón a una concentración del 0,8% (en p/v)

Tampón: NaAcetato 50 mM, pH 4,5

25 Las enzimas se diluyeron en el tampón, y debe determinarse la concentración correcta de la enzima para cada enzima. Se mezclaron 90 μ l de sustrato y 10 μ l de disolución de enzimas. Se midió un blanco sustituyendo la

disolución de enzimas por agua. Se realizó una incubación durante 30 min a 37 °C (seguida de 10 min a 4 °C). Se midieron los azúcares reductores después de mezclar 50 µl de la mezcla de enzima-sustrato incubado con 50 µl del reactivo DNSA-Reagent.

- 5 La actividad se calcula como unidades por µl o mg del producto de enzima. Una unidad se define como la cantidad de extremos reductores formados en µmol por minuto. Una unidad de proteasa se define como la formación de equivalentes de glicina por minuto.

La figura 1 muestra el efecto de las enzimas de mananasa sobre la ruptura de células y la extracción de carotenoides de *Haematococcus pluvialis*. Cuanto mayor sea la concentración de mananasa en la preparación de enzimas, mayor es el rendimiento de los carotenoides extraídos.

- 10 Algunas realizaciones de la presente descripción se refieren a:

A) Un método para mejorar la extractabilidad de una composición celular procedente de algas que comprende:

d) cultivar y hacer crecer células de algas hasta una biomasa de algas deseada,

e) someter la biomasa de algas a una composición de enzimas que comprende una o más enzimas capaces de degradar las células de algas,

- 15 f) extraer la composición celular de la biomasa de algas, en el que

- la composición celular puede seleccionarse del grupo que consiste en pigmentos, carotenoides, almidón, lípidos, ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), proteínas, vitaminas y nutrientes minerales.

- la composición celular puede ser astaxantina.

- las algas pueden ser *Haematococcus pluvialis* en forma fresca o en forma secada.

- 20 1. la composición de enzimas puede comprender una mananasa y una lipasa.

- la composición de enzimas puede comprender además una celulasa.

- la composición de enzimas puede comprender una mananasa y una proteasa.

- la composición de enzimas puede comprender una mananasa, una pectinasa y una celulasa.

- la composición de enzimas puede comprender una mezcla de enzimas con actividad principal mananasa.

- 25 - la composición de enzimas puede comprender el extracto de hongos filamentosos.

- los hongos filamentosos pueden cultivarse sobre algas.

- los hongos filamentosos pueden seleccionarse del grupo de *Aspergillus* y *Trichoderma*.

B) Un método para producir un componente de células de algas empleando un alga capaz de producir una cantidad eficaz de un componente celular, que comprende las etapas:

- 30 a) cultivar las algas en un medio líquido,

b) recolectar las algas,

c) romper las células de algas mediante un tratamiento enzimático con una composición de enzimas,

d) aislar el componente celular, en el que

- 35 - las células de algas pueden ser algas fotoautótrofas que pertenecen al orden Volvocales, preferiblemente a la familia Haematococcaceae, más preferiblemente al género *Haematococcus*, más preferiblemente a la especie *Haematococcus pluvialis*.

- el componente celular puede ser un carotenoide, preferiblemente astaxantina.

- la composición de enzimas puede comprender una mananasa, una pectinasa y una celulasa.

- 40 C) Un método para liberar los contenidos celulares que comprende poner en contacto una célula algal con una composición de enzimas que comprende una mananasa, una proteasa y una celulasa.

D) Un método para liberar los contenidos celulares que comprende poner en contacto una célula algal con una composición de enzimas que comprende una mananasa, una pectinasa y una celulasa.

E) Una composición para degradar las paredes celulares de algas verdes que comprende una mananasa, una pectinasa y una celulasa.

F) El uso de una composición de enzimas que comprende una mananasa, una pectinasa y una celulasa para la extracción de pigmentos de algas verdes.

5 Otras referencias bibliográficas

Las siguientes publicaciones adicionales se incorporan en la presente como referencia:

Abo-Shady, A.M., Y.A., 1993, Mohamed, y T. Lasheen, Chemical composition of the cell wall in some green algae species, *Biologia Plantarum*, 35:629-632.

10 Afi, L., P. Metzger, C. Largeau, J. Connan, C. Berkalo, y B. Rousseau, 1996, Bacterial degradation of green microalgae: incubation of *Chlorella emersonii* and *Chlorella vulgaris* with *Pseudomonas oleovorans* and *Flavobacterium aquatile*, *Org. Geochem.*, 25:117-130.

Allard, B., M.-N. Rager, y J. Templier, 2002, Occurrence of high molecular weight lipids (c80+) in the trilaminar outer cell walls of some freshwater microalgae. a reappraisal of algaenan structure, *Org. Geochem.*, 33:789-801.

15 Ban, K., M. Kaieda, T. Matsumoto, A. Kondo y H. Fukuda, 2001, Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles, *Biochem. Eng. J.*, 8:39-43

Belarbi, E.H., E. Molina, e Y. Chisti, 2000, A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil, *Enzyme Microb. Technol.*, 26:516-529.

Borowitzka M.A. y L.J. Borowitzka, editores, 1988, *Micro-Algal Biotechnology*, Cambridge University Press.

20 Carmen Cerón M., I. Campos, J.F. Sánchez F.G. Acien, E. Molina, y J.M. Fernández-Sevilla, 2008, Recovery of lutein from microalgae biomass: Development of a process for *Scenedesmus almeriensis* biomass, *J. Agric. Food Chem.*, 56:11761-11766.

Chisti, Y., 2007, Biodiesel from microalgae, *Biotechnology Advances*, 25:294-306.

Chisti Y. y M. Moo- Young, 1986, Disruption of microbial cells for intracellular products, *Enzyme Microb. Technol.*, 8:194-204.

25 Doucha J. y K. Livansky, 2008, Influence of processing parameters on disintegration of *Chlorella* cells in various types of homogenizers, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 81:431- 440.

Eriksen, N.T., 2008, Production of phycocyanin pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 80:1-14.

30 Fleurence J., 1999, The enzymatic degradation of algal cell walls: a useful approach for improving protein accessibility?, *J. Appl. Phycol.*, 11:313-314.

Imam S.H., M.J. Buchanan, H.-C. Shin, y W.J. Snell, 1985, The *Chlamydomonas* cell wall: Characterization of the wall framework, *J. Cell Biol.*, 101:1599-1607.

Logan, B. E., 2004, Extracting hydrogen and electricity from renewable resources, *Env. Sci. Technol.*, pp. 160A-167A.

35 McComb, R. B. y W. D. Yushok, 1958, Colorimetric estimation of D-glucose and 2-deoxy-D-glucose with glucose oxidase, *The Biochem. Res., Foundation*, pp. 417-422.

Mendes-Pinto, M.M., M.F.J. Raposo, J. Bowen, A.J. Young, y R. Morais, 2001, Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus pluvialis*: effects on astaxanthin recovery and implications for bioavailability, *J. Appl. Phycol.*, 13:19-24.

40 Molina Grima E., E.H. Belarbi, F.G. Acien Fernández, A. Robels Medina, e Y. Chisti, 2003, Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics, *Biotechnol., Adv.*, 20:491-515.

Richmond A.G., editor, 1986, *Handbook of Microalgal Mass Culture*, CRC Press, Inc.

Rittman, B.E., 2008, Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms, *Biotechnol., Bioeng.*, 100(2):203-212.

45 Shelef G. y C.J. Soder, editores, 1980, *Algae Biomass; Production and Use*, Elsevier/North- Holland Biomedical Press, Amsterdam, Países Bajos.

Versteegh, G.J.M., y P. Blokker, 2004, Resistant macromolecules of extant and fossil microalgae, *Phycol., Res.*, 52:325-339.

Washko M.E., y E. W. Rice, 1961, Determination of glucose by an improved enzymatic procedure, *Clinical Chem.*, 7:542-545.

- 5 Wurdack M.E., 1923, Chemical composition of the walls of certain algae, *Papers from the Department of Botany, Ohio State University*, 141:181-191.

Yatsu L.Y., y T.J. Jacks, 1972, Spherosome membranes, *Plant Physiol.*, 49:937-943.

Documento WO 2008/141757 A1

Documento WO 2009/033071 D

- 10 Documento WO 2011/138620

Cantidades eficaces de enzimas en las composiciones de enzimas según la presente descripción:

La mananasa puede añadirse en una cantidad eficaz en el intervalo de $0,3 \times 10^6$ - $1,6 \times 10^6$ unidades por tonelada de biomasa de algas.

- 15 La proteasa puede añadirse en una cantidad eficaz en el intervalo de $0,002 \times 10^6$ - 314×10^6 unidades por tonelada de biomasa de algas.

La xilanasa puede añadirse en una cantidad eficaz en el intervalo de $0,16 \times 10^6$ - 460×10^6 unidades por tonelada de biomasa de algas.

La 1,3(4)-beta-glucanasa puede añadirse en una cantidad eficaz en el intervalo de $0,2 \times 10^6$ - 400×10^6 unidades por tonelada de biomasa de algas.

- 20 La lipasa puede añadirse en una cantidad eficaz en el intervalo de $0,1 \times 10^6$ - 300×10^6 unidades por tonelada de biomasa de algas.

La laminarinasa puede añadirse en una cantidad eficaz en el intervalo de $0,2 \times 10^6$ - 400×10^6 unidades por tonelada de biomasa de algas.

REIVINDICACIONES

1.- Un método para mejorar la extractabilidad de astaxantina en forma del isómero (3S,3'S) a partir de una biomasa de algas, que comprende las etapas de:

5 a) someter la biomasa de algas a una composición de enzimas que comprende una mananasa, una laminarinasa y una lipasa,

b) extraer la astaxantina en forma del isómero (3S,3'S) de la biomasa de algas,

en el que las algas pertenecen a la especie *Haematococcus pluvialis*.

2.- El método según la reivindicación 1, en el que la composición de enzimas comprende además una proteasa.

10 3.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la composición de enzimas comprende además una celulasa.

4.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la composición de enzimas comprende además una pectinasa.

Figura 1

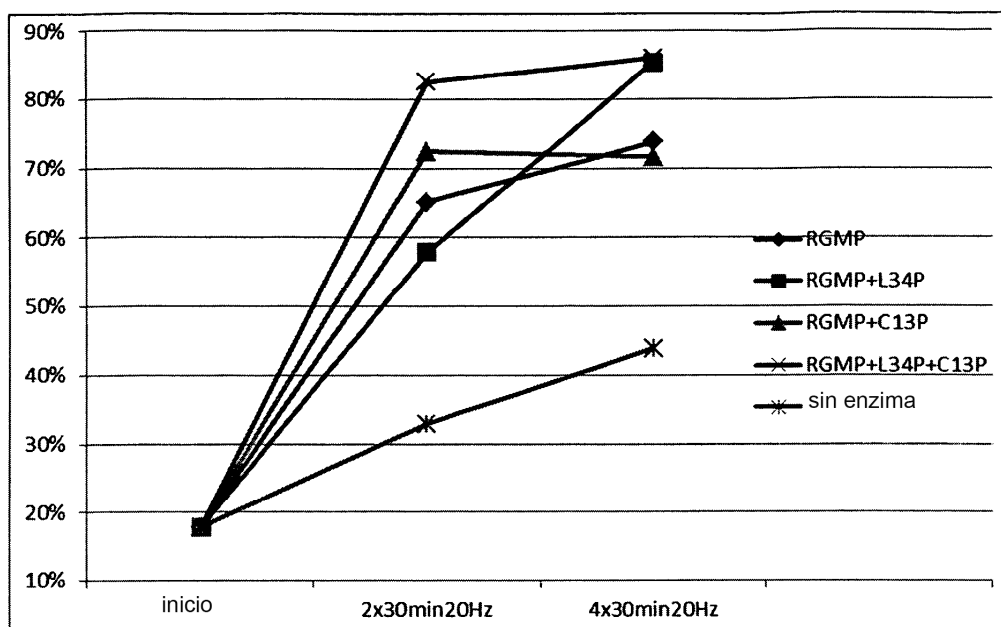


Figura 2

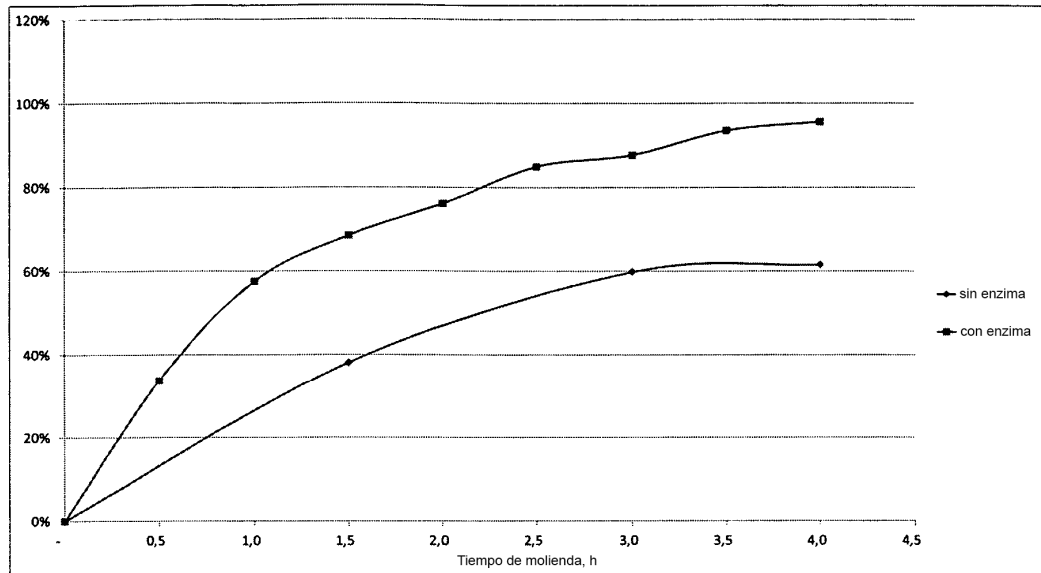


Figura 3

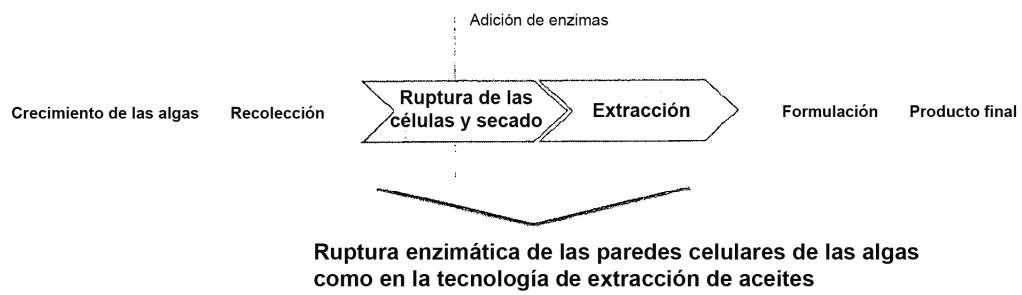


Figura 4

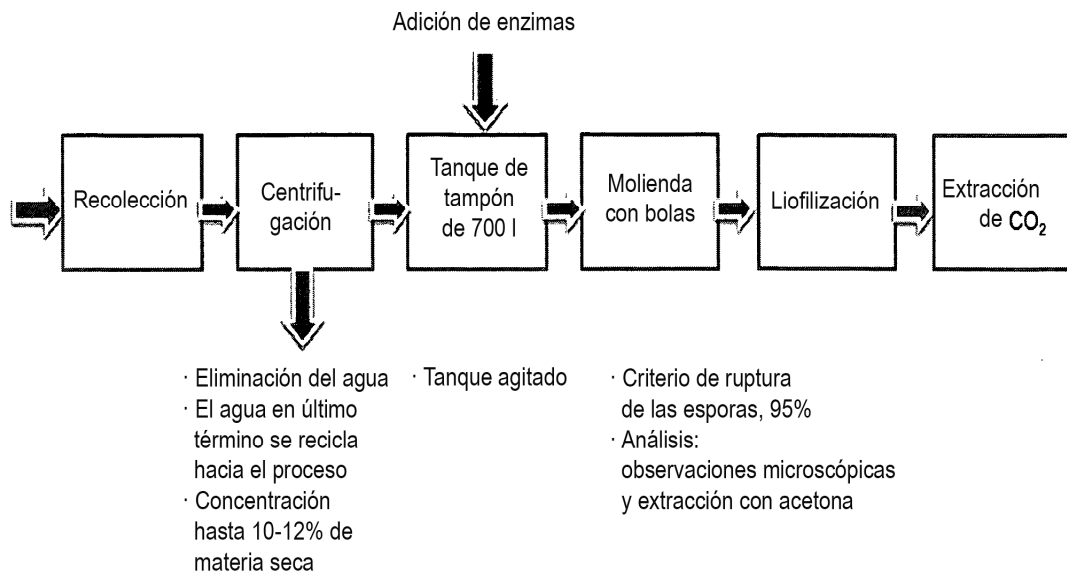


Figura 5

