



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 209 570**

⑫ Número de solicitud: 200101034

⑤① Int. Cl.7: **C12N 1/12**
C12P 23/00

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫② Fecha de presentación: **27.04.2001**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2004**

Fecha de la concesión: **12.08.2005**

⑫⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **01.10.2005**

⑫⑤ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.10.2005

⑦③ Titular/es: **Universidade da Coruña**
OTRI-E.T.S.I. Caminos, Canales y
Puertos-Campus de Elviña
15071 A Coruña, ES

⑦② Inventor/es: **Abalde Alonso, Julio;**
Orosa García, Miguel y
Herrero López, Concepción

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Procedimiento para la obtención de células vegetativas (flageladas) de *Haematococcus* ricas en astaxantina.**

⑤⑦ Resumen:

Procedimiento para la obtención de células vegetativas (Flageladas) *Haematococcus pluvialis* ricas en astaxantina.

Se refiere la invención a un procedimiento para la obtención de células vegetativas y flageladas de microalgas clorofíceas del género *Haematococcus pluvialis* ricas en el carotenoide astaxantina en una sola fase.

Se caracteriza este invento por la modificación de la composición pigmentaria de la microalga mediante cambios fenotípicos y la resolución del problema técnico de la obtención de astaxantina en fase vegetativa, evitando la síntesis de la gruesa pared celular, lo que facilita la extracción del pigmento y haciéndolo más aprovechable para fines industriales y permitir la realización y recogida del cultivo en una única fase en cultivos discontinuos. La síntesis y acumulación de cetocarotenoides en el procedimiento propuesto se realiza en condiciones de no limitación de nutrientes, sobre todo en la fuente de nitrógeno a una concentración de 3 mM y con fuente de carbono orgánica (acetato o malonato) a una concentración entre 10 y 20 mM y con alta intensidad de luz (entre 250 y 350 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), lo que permite un aumento de la densidad celular y acumulación de cetocarotenoides produciéndose simultáneamente el aumento de biomasa y la concentración de pigmentos carotenoides. Este hecho permite una utilización directa como suplemento alimenticio en acuicultura, así como fuente natural de astaxantina para la industria farmacéutica y cosmética.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la obtención de células vegetativas (Flageladas) *Haematococcus* ricas en astaxantina.

5 Objeto de la invención

Se refiere la invención a la obtención de células vegetativas y flageladas de microalgas clorofíceas del género *Haematococcus pluvialis* ricas en el carotenoide astaxantina. La invención se basa en la utilización de sistemas de cultivo en una única fase que se realiza utilizando una combinación de fuente de nitrógeno (nitrato o una fuente orgánica), fuente de carbono orgánica y una intensidad de luz alta. De esta forma se produce la acumulación de la astaxantina y el crecimiento celular.

Antecedentes de la invención

Para este procedimiento, se utilizó la especie microalgas más estudiada del género *Haematococcus*, *Haematococcus pluvialis*, bien conocida por su capacidad para acumular el cetocarotenoide astaxantina, siendo este procedimiento igualmente aplicable a cualquier otra especie del género.

H. pluvialis, y el resto de los miembros del género, posee un ciclo de vida que comprende dos etapas: una vegetativa, verde y móvil en la que las células se dividen continuamente y se caracteriza por la presencia de clorofila como pigmento principal y una forma de resistencia (quiste), roja, en la que la división celular se detiene, el contenido de clorofila se reduce y se produce un incremento constante en el contenido de astaxantina.

Debido a estas diferencias, las dos etapas se separan en los sistemas actuales de cultivo, estableciendo dos sistemas de cultivo distintos y dos medios de cultivo también diferentes. En la fase vegetativa se establecen las condiciones óptimas para la división celular se mantienen para alcanzar el máximo crecimiento. En la segunda fase, la roja, se establecen las condiciones inductoras óptimas para que se produzca la acumulación de astaxantina.

Para la inducción de la síntesis de carotenoides por estas especies se han utilizado deficiencias nutritivas como son carencias de nitrógeno, fosfato, magnesio, etc. Además el tipo de fuente de carbono utilizable es dependiente de la luz. En presencia de luz se produce la acumulación de astaxantina tanto con CO₂ como con acetato, mientras que en ausencia de luz únicamente se acumula en presencia de acetato. No solo las carencias de nutrientes producen la acumulación de astaxantina, sino que la existencia de grandes cantidades de determinados compuestos también provoca la carotenogénesis; así la adición de grandes cantidades de cloruro sódico, hierro y magnesio provoca la acumulación de carotenoides.

Otros factores físicos, como son temperatura e iluminación, influyen en la síntesis de astaxantina. Estos factores desencadenan la carotenogénesis cuando alcanzan valores que superan los límites en los que es posible el crecimiento celular. El rango de temperatura en los que se produce el crecimiento es entre 18 y 28°, si bien no se ha utilizado este parámetro como factor desencadenante de la carotenogénesis. En lo que respecta a la intensidad de luz, por encima de valores por encima de 90 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (19.6 W m⁻²) no se produce crecimiento, sin embargo, la síntesis de astaxantina se produce con intensidades de luz superiores a 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (87.2 W m⁻²), siendo establecida la intensidad óptima para esa síntesis en 1600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (348.8 W m⁻²). Sin embargo la intensidad de luz no parece ser por sí sola un factor determinante ya que se ha demostrado la síntesis de astaxantina en oscuridad. Elevadas intensidades luminosas conjuntamente con la ausencia de nitrógeno en el medio son los responsables de la inducción de la síntesis de astaxantina.

En general, los sistemas en los que se inducen la síntesis de astaxantina se caracterizan por condiciones que detienen el crecimiento celular pero que no interfieren en la asimilación de carbono. Estos procedimientos utilizados para la inducción de la acumulación de este pigmento conducen al rápido cese de la división celular y a la síntesis de una gruesa pared celular de un compuesto semejante a la esporopolenina, macromoléculas extraordinariamente resistentes frente a agentes químicos y a la degradación biológica, que se consideran formadas por polímeros de carotenoides. Este proceso convierte la célula flagelada en una espora o hematociste de gruesa pared, lo que la hace difícilmente digerible por los organismos sin un procesamiento previo. Además, la resistencia de la pared a la ruptura y degradación obliga a la utilización de medios muy agresivos para la extracción del pigmento. La astaxantina es muy sensible a la temperatura, luz, agentes oxidantes, etc., convirtiéndose en el carotenoide denominado astacene; el astacene, forma oxidada de la astaxantina ha perdido todas las propiedades que hacen interesante este compuesto (capacidad de pigmentación y como antioxidante), lo que convierte al astacene en un compuesto de valor económico nulo.

El hecho de que la acumulación de astaxantina se produzca en fases de resistencia celulares que se caracterizan por el cese del crecimiento y cambios morfológicos dramáticos, obliga que a los sistemas de cultivos se realicen en sistemas de cultivo discontinuos en dos fases, una fase de crecimiento activo cuyo objetivo es incrementar la biomasa del sistema y una segunda fase, una vez cesado el crecimiento, de acumulación de astaxantina acompañada de cambios morfológicos en las células y acumulación de carotenoides.

Esta separación entre las fase de acumulación pigmentaria y crecimiento celular hace que en los sistemas de producción de astaxantina por *Haematococcus* sea necesario la realización del cultivo en dos fases, la primera vez

con células y, posteriormente, en la segunda inducir la formación de esporas de pared celular gruesa y ricas en astaxantina.

Constituye, por tanto, el objetivo de la presente invención resolver el problema técnico de la obtención de astaxantina en fase vegetativa, evitando la síntesis de la gruesa pared celular, lo que facilita la extracción del pigmento y haciéndolo más aprovechable para fines industriales y permitir la realización y recogida del cultivo en una única fase en cultivos discontinuos. Al producirse la acumulación de astaxantina en fase de crecimiento vegetativo, permitiría la utilización de sistemas de cultivo semicontinuos. La invención se realiza con un proceso, que utilizando sistemas de cultivos aireados discontinuos o semicontinuos, en crecimiento exponencial de microalgas del género *Haematococcus*, particularmente *Haematococcus pluvialis*, obtiene células vegetativas con altas concentraciones de astaxantina, en concentraciones no limitantes para el crecimiento de la microalga, con una combinación de fuente de nitrógeno (nitrato sódico o fuente orgánica), fuente orgánica de carbono y condiciones de alta intensidad luminosa.

Sumario de la invención

Preparación del medio de cultivo básico

La microalga *Haematococcus pluvialis* es capaz de crecer en los medios de cultivo típicos de microalgas dulcea-cuicolas, siendo la composición de uno de los medios de cultivo que producen los mejores resultados la siguiente para un volumen final de un litro (Brown et al., 1967):

CaCl ₂ x 2H ₂ O	0.025 g/l
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0.075 g/l
K ₂ HPO ₄	0.075 g/l
KH ₂ PO ₄	0.175 g/l
NaCl	0.025 g/l
Agua destilada	1 litro

Además, se le añade una fuente de nitrógeno en una concentración de 3 mM. Además de fuente de nitrógeno orgánica utilizaron distintas fuentes de carbono orgánica, principalmente acetato y malonato en forma de sal sódica. Estas fuentes de carbono se han utilizado en concentraciones entre 10 y 20 mM ya que en concentraciones superiores se obtienen resultado negativos.

Los medios de cultivo, una vez preparados, se ajustan a pH 7 y se esteriliza. El método de esterilización varía en función del tipo de fuente de nitrógeno utilizada. Si se utiliza nitrógeno inorgánico (NaNO₃, en el medio de cultivo número 4 de la tabla I) la esterilización se efectúa en el autoclave a 120°C durante 20 minutos; si la fuente de nitrógeno utilizada es orgánica (el ácido úrico, amonio o urea) la mejor forma de esterilizar el medio de cultivo es la filtración.

Al medio de cultivo estéril de *Haematococcus* se le añaden, a la llama, 2 ml/l de una solución stock de oligoelementos (Fábregas et al., 1984) para dar las concentraciones finales siguientes:

ZnCl ₂	1.0 µM
MnCl ₂ x 4H ₂ O	1.0 µM
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	1.0 µM
CoCl ₃	0.1 µM
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.1 µM
Citrato férrico	20 µM
Tiamina	35 µg/l
Biotina	5 µg/l
Vitamina B ₁₂	3 µg/l

Los oligoelementos se preparan añadiendo 25 gr. de Algal (Nutrición Avanzada S.A.) en un litro de agua destilada, se esterilizan en el autoclave a 120°C durante 20 minutos, almacenándose esta solución stock a 4°C en oscuridad.

La agitación de los cultivos utilizados para las experiencias se realiza mediante burbujeo de aire, inyectado con un turbosoplador y filtrado a 0.20 µm mediante filtros Millipore FG antes de la entrada en el cultivo. Esta agitación constante impide que las células sedimenten y permite que las células estén expuestas a la misma intensidad lumínica media, evitando así mismo la formación de gradientes, minerales o gaseosos, obteniéndose un crecimiento más uniforme (Raven and Geider, 1988). La aireación puede ser suplementada con CO₂ en forma continua o en pulsos, el cual actúa tamponando el medio de cultivo. Los cultivos, en todos los casos, son sincronizados. Además de los nutrientes, existen otros factores físicos fundamentales para el crecimiento microalgal. El cultivo se realiza a una temperatura entre 18 y 25°C, la variación de la temperatura entre estos rangos no supone una modificación significativa de los resultados obtenidos en la acumulación pigmentaria.

Fuente de nitrógeno y carbono

La base de la invención propuesta es la utilización conjunta, en la composición del medio de cultivo de una combinación de fuentes de nitrógeno y de carbono orgánicas que, combinados con un alta iluminación son los responsables de que las células de *Haematococcus* acumulen astaxantina manteniendo las características de crecimiento activo. Las fuentes de nitrógeno que se utilizan son: Nitrato sódico (fuente inorgánica), amonio carbonato y urea (fuentes orgánicas). La concentración utilizada es de 3 mM. Las fuentes de carbono orgánicas utilizadas son: ácido úrico, acetato sódico y malonato sódico. Estas fuentes de carbono se han utilizado en concentraciones entre 10 y 20 mM ya que en concentraciones superiores se obtienen resultado negativos.

Iluminación

El otro aspecto básico de la presente invención es la iluminación. La iluminación utilizada en este procedimiento propuesto debe ser siempre superiores a $250 \mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (54.5 W m^{-2}) medida a la altura media del recipiente y en ambas direcciones, proporcionada por tubos fluorescentes de luz blanca, aplicada con un ritmo nictimeral 12:12 h., obteniéndose el máximo de productividad a valores de iluminación a $350 \mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (76.3 W m^{-2}).

Descripción detallada de las variantes de la invención

Se muestran a continuación los resultados que se han obtenidos con las distintas variantes de los medios de cultivos en los que se basa la presente invención. La tabla 1 muestra los resultados obtenidos en las distintas formulaciones. Las combinaciones establecidas son: ácido úrico, ácido úrico y acetato sódico, ácido úrico y malonato sódico, nitrato sódico y malonato, amonio carbonato y acetato sódico y urea y acetato sódico. Cualquiera de estos sistemas son variantes de la presente invención y pueden ser utilizadas para obtener células flageladas de *Haematococcus* con alta concentración de astaxantina.

TABLA 1

Medio de cultivo (fuente de nitrógeno)	concentración de astaxantina (mg.g ⁻¹ de peso seco de biomasa)	Aumento en biomasa respecto al inóculo
1.-Ácido úrico	4,41 ± 0,22	x 4,42 ± 0,09
2.-Úrico + acetato	8,93 ± 0,28	x 4,42 ± 0,09
3.-Úrico + malonato	8,73 ± 0,12	x 4,58 ± 0,08
4.-Nitrato + malonato	4,10 ± 0,78	x 4,38 ± 0,10
5.-Amonio carbonato + acetato	9,84 ± 0,20	x 2,35 ± 0,32
6.-Urea + acetato	6,07 ± 0,49	x 2,80 ± 0,13

La mejor fuente de nitrógeno para la obtención de células flagelados rojas de *Haematococcus pluvialis* es el ácido úrico en forma de su sal sódica. También se obtienen buenos resultados con amonio carbonato o urea. En todos los casos la obtención de astaxantina mejora al adicionar además de la fuente de nitrógeno, una fuente orgánica de carbono, como son acetato sódico o malonato sódico (el piruvato sódico o la glucosa pueden ser también utilizados pero con peores resultados). (Ver resultados en tabla 1).

La obtención de células vegetativas de *Haematococcus* ricas en astaxantina utilizando conjuntamente ácido úrico, como fuente orgánica de nitrógeno, y de una fuente orgánica de carbono, principalmente acetato sódico o malonato sódico a una concentración entre 10-20 mM, duplica los resultados obtenidos sin la adición de la fuente de carbono orgánico. Concentraciones mayores de estos compuestos orgánicos inhiben el crecimiento e inducen la transformación de las células en aplanosporas y hematocistes con la consiguiente elaboración de una gruesa pared celular, efecto no deseado.

En todos los casos anteriores la biomasa microalgal alcanza en seis días un máximo de astaxantina manteniéndose la proporción de células flageladas por encima del 90%. En estos seis días de crecimiento la biomasa microalgal aumenta, en casi todos los casos, 4.5 veces.

La astaxantina aquí cuantificada representa la suma de la astaxantina en forma esterificada (monoésteres y diésteres) junto con la astaxantina que aparece sin esterificar. Además de astaxantina, se sintetizan otros carotenoides como el beta-caroteno, luteína, zeaxantina, cantaxantina, equinenona, etc. de interés como antioxidantes y colorantes. Mediante este procedimiento, la biomasa obtenida, puede ser, una vez recogida, empleada directamente en suplementación alimentaria para peces (salmón, trucha, carpa o peces tropicales), diversos crustáceos y otros animales que necesitan de cierta pigmentación en la carne (pollos), en las plumas (muchas aves) o en la yema de los huevos (aves de corral). Debe tenerse la precaución de no exponer esta biomasa durante largos periodos a altas temperaturas o luz intensa para que, como se indicó anteriormente, no se degraden los carotenoides. Una buena forma de conservación de esta biomasa microalgal de células vegetativas de *Haematococcus* rica en astaxantina es la congelación rápida unida a

la adición de un antioxidante (1-2% de hidroxitolueno butilado BHT).

Modo de realización de la invención

5 Como ejemplo de la presente invención se han elegido, entre las distintas variantes, las condiciones óptimas. Se estableciendo cultivos de esta microalga con un medio de cultivo, cuya fuente de nitrógeno es el ácido úrico a una concentración de 3 mM y el acetato sódico es la fuente de carbono a una concentración de 20 mM. Los cultivos se establecen en un fotobiorreactor cerrado, en el que la temperatura se mantiene en un margen entre los 18-25°C y una iluminación de 350 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (76.3 W m^{-2}), el pH en un rango de valor de entre 5 y 7. Las microalgas se recogen
10 por centrifugación, obteniéndose un concentrado celular de *Haematococcus* rico en astaxantina, en la que no existen paredes celulares gruesas lo que hace que esta materia húmeda sea indicada para su utilización directa pasando a formar parte de formulaciones de dietas en acuicultura u otras aplicaciones típicas de este carotenoide sin necesidad de extracción.

15 Una variante de modo de realización de la invención consistiría en utilizar los mismos parámetros fisico-químicos y un sistema de cultivo semi-continuos establecimiento un sistema diario de renovación del medio de cultivo. La tasa de renovación se establecería en un rango entre el 20 y un 40% del volumen de cultivo, y biomasa, sustituido diariamente por el mismo volumen de medio de cultivo nuevo.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la obtención de células vegetativas (flageladas) de *Haematococcus pluvialis* ricas en astaxantina en una sola fase, **caracterizado** por realizarse el crecimiento y la acumulación de astaxantina en la fase de crecimiento exponencial, con presencia de fuente de nitrógeno (orgánica o inorgánica) en el medio y fuente orgánica de carbono. Las fuentes de nitrógeno utilizadas son: Nitrato sódico (fuente inorgánica) amonio carbonato y urea (fuentes orgánicas)) La concentración de la fuente de nitrógeno de 3 mM. Las fuentes de carbono)) son acetato sódico o malonato sódico. La concentración de la fuente de carbono es entre 10 y 20 mM. El cultivo se realiza en condiciones de alta iluminación entre $250 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. (54.5 W m^{-2}) y $350 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (76.3 W m^{-2}). La temperatura de crecimiento es entre 18 y 25°C .

2. Procedimiento para la obtención de células vegetativas (flageladas) de *Haematococcus pluvialis* ricas en astaxantina en una sola fase estableciendo cultivos de esta microalga, cuya fuente de nitrógeno es el ácido úrico a una concentración de 3 mM y el acetato sódico como fuente de carbono a una concentración de 20 mM. Los cultivos se establecen en un fotobiorreactor cerrado y una iluminación de $350 \mu\text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (76.3 W m^{-2}).

3. Procedimiento para la obtención de células vegetativas (flageladas) de *Haematococcus pluvialis* ricas en astaxantina en una sola fase, en las condiciones de las reivindicación 1 y 2, utilizando un sistema de cultivo semicontinuo (ciclostato).

4. Procedimiento para la obtención de células vegetativas (flageladas) de *Haematococcus* ricas en astaxantina en una sola fase, en las condiciones de las reivindicaciones 1, 2 y 3, utilizando cualquier otra especie del género *Haematococcus*.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 209 570

⑫ Nº de solicitud: 200101034

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 27.04.2001

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.7: C12N 1/12, C12P 23/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	FR 2620131 A1 (COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE) 10.03.1989, página 3, línea 13 - página 5.	
A	HAGEN, C. et al. Effect of cultivation parameters on growth and pigment biosynthesis in flagellated cells of Haematococcus pluvialis. Journal of Applied Phycology, 2001, Vol. 13, páginas 79-87.	
A	OROSA, M. et al. Carotenoid accumulation in Haematococcus pluvialis in mixotrophic growth. Biotechnology Letters, 2001, Vol. 23, páginas 373-378.	
A	LEE, Y.K. y SOH, C-W. Accumulation of astaxanthin in Haematococcus lacustris (Chlorophyta). J. Phycol., 1991, Vol. 27, páginas 575-577.	
A	FÁBREGAS, J. et al. Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga Haematococcus pluvialis. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2000, Vol. 53, páginas 530-535.	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

19.05.2004

Examinador

A. Polo Díez

Página

1/1