

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 674**

51 Int. Cl.:  
**C12P 23/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04787716 .2**  
96 Fecha de presentación: **08.09.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1676925**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.07.2006**

54 Título: **Proceso para producir zeaxantina y beta-criptoxantina**

30 Prioridad:  
17.09.2003 JP 2003325104  
17.09.2003 JP 2003325130  
17.09.2003 JP 2003325144

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**28.09.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**28.09.2012**

73 Titular/es:  
**JX Nippon Oil & Energy Corporation**  
**6-3, Otemachi 2-chome Chiyoda-ku**  
**Tokyo 100-8162, JP**

72 Inventor/es:  
**TSUBOKURA, Akira;**  
**YONEDA, Hisashi y**  
**HIRASAWA, Kazuaki**

74 Agente/Representante:  
**Pérez Barquín, Eliana**

ES 2 387 674 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Proceso para producir zeaxantina y beta-criptoxantina

5 **Campo técnico**

Se da a conocer en el presente documento un proceso microbiológico para producir zeaxantina,  $\beta$ -caroteno, licopeno o una mezcla de carotenoides de los mismos, útiles como pigmento amarillo natural, pigmento rojo natural o antioxidante para alimentación, alimentos, cosméticos, productos farmacéuticos y similares.

10

**Antecedentes de la técnica**

La zeaxantina está contenida en diversas plantas tales como maíz, se añade a la alimentación como pigmento amarillo natural y se sabe que tiene aplicaciones para mejorar el tono de color de la yema de huevo, carne o piel de un ave de corral tal como pollo y se usa como agente colorante para alimentos. También tiene un potente efecto antioxidante (Fisheries Science, 62(1): 134-137, 1996), y se ha notificado que tiene un efecto antitumoral (Biol. Pharm. Bull., 18(2): 227-233, 1995). Se sabe que la zeaxantina, junto con la luteína, está presente en la retina y el cristalino y está implicada en el mantenimiento de la salud del ojo (FOOD Style 21, 3(3): 50-53, 1999). Debido a estos efectos fisiológicos, la zeaxantina es útil como alimento para la salud, cosmético o material farmacéutico. La  $\beta$ -criptoxantina está contenida en cítricos, se sabe que tiene un efecto antitumoral (Biol. Pharm. Bull., 18(2): 227-233, 1995) y tiene aplicaciones como material alimenticio o componente de composición para alimentación. El  $\beta$ -caroteno tiene acciones antioxidantes y de provitamina A y se usa ampliamente como aditivo para piensos, aditivo para alimentos, agente colorante natural o similares.

15

20

25

30

35

Se conocen como proceso para producir zeaxantina síntesis químicas usando, como material de partida, una hidroxicetona ópticamente activa obtenida mediante la reducción asimétrica de oxoisoforona (Pure Appl. Chem., 63(1): 45, 1991) y extracción a partir de semillas de maíz (Seitai Shikiso (Biochrome), 1974, Asakura-shoten). También se conoce un proceso mediante extracción a partir de caléndula (publicación de patente japonesa (Kokai) n.º 08-092205 A (1996)); sin embargo, un carotenoide derivado de caléndula comprende principalmente luteína y tiene un contenido en zeaxantina reducido. Además, los microorganismos para la producción del mismo incluyen *Spirulina algae* (publicación de patente japonesa (Kokai) n.º 10-155430 A (1998)), microalgas *Nannochloris spp.* (publicación de patente japonesa (Kokai) n.º 07-059558 A (1995)), bacterias *Flexibacter spp.* (publicación de patente japonesa (Kokai) n.º 05-328978 A (1993)), bacterias *Alteromonas spp.* (publicación de patente japonesa (Kokai) n.º 05-049497 A (1993)), bacterias *Flavobacterium spp.* (Carotenoids, en Microbial Technology, 2ª edn, vol. 1, 529-544, Nueva York: Academic Press), *Agrobacterium aurantiacum* (FEMS Microbiology Letters, 128: 139-144, 1995) y una cepa bacteriana, E-396 (FERM BP-4283) que pertenece a un género novedoso (publicación de patente japonesa (Kokai) n.º 07-079796 A (1995), publicación de patente japonesa (Kokai) n.º 08-009964 A (1996), documento US 5607839 y documento US 5858761).

40

45

El  $\beta$ -caroteno es un carotenoide amarillo natural contenido en vegetales verdes y amarillos tales como zanahoria y encuentra un amplio uso como agente colorante para alimentos tales como mantequilla y margarina. También tiene actividad de provitamina A y es un nutriente importante para seres humanos. Se sabe que esta sustancia tiene un efecto antioxidante (Fisheries Science, 62(1): 134-137, 1996) y se ha notificado que tiene efectos antitumorales y anticancerígenos (Biol. Pharm. Bull., 18(2): 227-233, 1995). Debido a estos efectos fisiológicos, el  $\beta$ -caroteno es útil no sólo como agente colorante, sino también como material funcional para su uso en piensos, alimentos, cosméticos o productos farmacéuticos.

50

55

Se conocen como proceso para producir  $\beta$ -caroteno síntesis químicas a partir de  $\beta$ -ionona (Pure Appl. Chem., 63(1): 45, 1979) y extracción a partir de vegetales verdes y amarillos tales como zanahoria, batata y calabaza (Tennen Chakusyokuryo (Natural Coloring Agents) Handbook, Korin Publishing Co., Ltd., Tennen Chakusyokuryo Handbook Editorial board ed.). Además, como ejemplo de producción de  $\beta$ -caroteno mediante un microorganismo, se conoce mediante algas *Dunaliella* (J. Phycol., 23: 176, 1987), *Blakeslea trispora* (hongos filamentosos) (Appl. Environ. Microbiol. 36: 639-642, 1979), *Phaffia rhodozyma* (levadura) (publicación de patente japonesa (Kokai) n.º 05-168465 A (1993)), levaduras *Rhodotorula spp.* (publicación de patente japonesa (Kokai) n.º 06-022748 A (1994)), *Agrobacterium aurantiacum* (FEMS Microbiology Letters, 128: 139-144, 1995) o la cepa E-396 bacteriana (FERM BP-4283) que pertenece a un género novedoso (publicación de patente japonesa (Kokai) n.º 07-079796 A (1995), publicación de patente japonesa (Kokai) n.º 08-009964 A (1996), documento US 5607839 y documento US 5858761).

60

65

El licopeno es un carotenoide rojo natural contenido en el tomate y útil como agente colorante para alimentos. También tiene un potente efecto antioxidante (Arch. Biochem. Biophys., 271: 532, 1989), se sabe que inhibe la oxidación de lipoproteínas de baja densidad asociadas con arteriosclerosis (Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis 7: 433, 1997) y se ha notificado que suprime la proliferación de células cancerosas (J. Natl. Cancer Inst. 91: 313, 1999). Debido a estos efectos fisiológicos, el licopeno es útil como material para su uso en piensos, alimentos, cosméticos o productos farmacéuticos.

Se conocen como proceso para producir licopeno síntesis químicas usando linalool o geraniol como material de partida (publicación de patente japonesa (Kokai) n.º 2001-039943 A (2001)) y separación y refinado a partir de tomate (publicación de patente japonesa (Kokai) n.º 2002-193850 A (2002)). Además, los microorganismos para la producción de licopeno incluyen algas *Dunaliella* (publicación de patente japonesa (Kokai) n.º 2001-161391 A (2001)), algas *Chlorella* (publicación de patente japonesa (Kokai) n.º 2000-152778 A (2000)) y bacterias *Rhodobacter spp.* (publicación de patente japonesa (Kokai) n.º 08-239658 A (1996)). La cepa bacteriana E-396 (FERM BP-4283) que pertenece a un género novedoso (publicación de patente japonesa (Kokai) n.º 07-079796 A (1995), publicación de patente japonesa (Kokai) n.º 08-009964 A (1996), documento US 5607839 y documento US 5858761) también se sabe que produce compuestos carotenoides a altas concentraciones, aunque el nivel de producción de licopeno es mínimo.

Sin embargo, los procesos descritos anteriormente para sintetizar químicamente zeaxantina,  $\beta$ -caroteno y licopeno tienen problemas en cuanto a seguridad y la tendencia direccional de los últimos años ha sido hacia un producto natural debido a su uso de disolventes orgánicos. Además, el cultivo convencional usando un microorganismo no es práctico debido a la baja productividad, y la extracción a partir de una planta (por ejemplo, maíz, zanahoria, tomate o similares) tiene las desventajas de requerir demasiado coste debido a su bajo contenido de un compuesto carotenoides deseado y haciendo que su suministro estable sea difícil debido a la dependencia de la meteorología. La cepa E-396, que se conoce como un microorganismo que produce compuestos carotenoides, tiene bajas proporciones de producto de zeaxantina,  $\beta$ -caroteno y licopeno con respecto a los carotenoides totales, aunque ha proporcionado un proceso establecido para producir, a altas concentraciones en una escala industrial, compuestos carotenoides que tienen una seguridad ya confirmada mediante diversas pruebas e incluyendo astaxantina.

Por tanto, hay una necesidad de un proceso barato para producir zeaxantina,  $\beta$ -caroteno y licopeno con alta seguridad, mediante el cual puedan suministrarse de manera estable.

### Exposición de la invención

Como resultado de estudios intensivos para solucionar los problemas descritos anteriormente, los presentes inventores han descubierto que los microorganismos que producen compuestos carotenoides tales como astaxantina pueden someterse a tratamiento por mutación para proporcionar fácilmente microorganismos que tienen altas proporciones de producto de zeaxantina y  $\beta$ -criptoxantina con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides, logrando de ese modo la presente la presente invención.

Por tanto, la presente invención proporciona un proceso tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. Se da a conocer en el presente documento;

(1) Un proceso para producir zeaxantina o una mezcla de carotenoides que contiene zeaxantina, que comprende inducir una mutación en un microorganismo que produce astaxantina en el que la secuencia de bases de ADN que corresponde al ARN ribosómico 16S es sustancialmente homóloga a la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 1; seleccionar una cepa mutante que tiene una proporción de producto superior (% en masa) de zeaxantina con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides que la cepa original para proporcionar un microorganismo que produce zeaxantina; cultivar el microorganismo que produce zeaxantina; y recoger la zeaxantina o una mezcla de carotenoides que contiene zeaxantina del cultivo resultante.

(2) El proceso descrito en el punto (1) anterior en el que la selección de una cepa mutante que tiene una proporción de producto superior (% en masa) de zeaxantina con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides que la cepa original es una etapa que comprende seleccionar colonias amarillas a naranjas en un medio sólido.

(3) El proceso descrito en el punto (1) ó (2) anterior en el que la proporción de la zeaxantina producida por el microorganismo que produce zeaxantina es el 20 % en masa o más con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides.

(4) El proceso descrito en cualquiera de los puntos (1) a (3) anteriores en el que la proporción de cada una de equinenona, 3-hidroxi equinenona, asteroidenona, cantaxantina, adonirubina, adonixantina y astaxantina producida por el microorganismo que produce zeaxantina es menor del 10 % en masa con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides.

(5) El proceso descrito en cualquiera de los puntos (1) a (4) anteriores en el que la mezcla de carotenoides que contiene zeaxantina comprende  $\beta$ -criptoxantina y/o  $\beta$ -caroteno.

(6) El proceso descrito en cualquiera de los puntos (1) a (5) anteriores en el que el microorganismo que produce astaxantina se selecciona de una cepa, E-396 (FERM BP-4283) y cepas mutantes de la misma, y una cepa, A-581-1 (FERM BP-4671) y cepas mutantes de la misma.

- 5 (7) Un proceso para producir  $\beta$ -caroteno o una mezcla de carotenoides que contiene  $\beta$ -caroteno, que comprende inducir una mutación en un microorganismo que produce carotenoides como cepa original para la mutación en el que la secuencia de bases de ADN que corresponde al ARN ribosómico 16S es sustancialmente homóloga a la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 1 y que produce al menos un compuesto carotenoide seleccionado de equinenona,  $\beta$ -criptoxantina, 3-hidroxi equinenona, asteroidenona, cantaxantina, zeaxantina, adonirubina, adonixantina y astaxantina; seleccionar una cepa mutante que tiene una proporción de producto superior (% en masa) de  $\beta$ -caroteno con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides que la cepa original para proporcionar un microorganismo que produce  $\beta$ -caroteno; cultivar el microorganismo que produce  $\beta$ -caroteno; y recoger  $\beta$ -caroteno o la mezcla de carotenoides que contiene  $\beta$ -caroteno del cultivo resultante.
- 10 (8) El proceso descrito en el punto (7) anterior, comprendiendo el proceso usar, como cepa original para la mutación, un microorganismo que produce carotenoides para el que la proporción de la cantidad de producción combinada de cantaxantina y equinenona con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides es del 50 % en masa o más.
- 15 (9) El proceso descrito en los puntos (7) u (8) anteriores, comprendiendo el proceso usar, como cepa original para la mutación, un microorganismo que produce carotenoides para el que la proporción de la cantidad de producción combinada de zeaxantina y  $\beta$ -criptoxantina con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides es del 50 % en masa o más.
- 20 (10) El proceso descrito en cualquiera de los puntos (7) a (9) anteriores en el que la selección de una cepa mutante que tiene una proporción de producto superior (% en masa) de  $\beta$ -caroteno con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides que la cepa original es una etapa que comprende seleccionar colonias amarillas a naranjas en un medio sólido.
- 25 (11) El proceso descrito en cualquiera de los puntos (7) a (10) anteriores en el que la proporción de  $\beta$ -caroteno producido por el microorganismo que produce  $\beta$ -caroteno es del 50 % en masa o más con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides.
- 30 (12) El proceso descrito en cualquiera de los puntos (7) a (11) anteriores en el que la proporción de cada uno de equinenona,  $\beta$ -criptoxantina, 3-hidroxi equinenona, asteroidenona, cantaxantina, zeaxantina, adonirubina, adonixantina y astaxantina producida por el microorganismo que produce  $\beta$ -caroteno es menor del 20 % en masa con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides.
- 35 (13) El proceso descrito en cualquiera de los puntos (7) a (12) anteriores en el que el microorganismo que produce carotenoides se selecciona de una cepa, E-396 (FERM BP-4283) y cepas mutantes de la misma, y una cepa, A-581-1 (FERM BP-4671) y cepas mutantes de la misma.
- 40 (14) Un proceso para producir licopeno o una mezcla de carotenoides que contiene licopeno, que comprende inducir una mutación en un microorganismo que produce carotenoides como cepa original para la mutación, en el que la secuencia de bases de ADN que corresponde al ARN ribosómico 16S es sustancialmente homóloga a la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 1 y que produce al menos un compuesto carotenoide seleccionado de  $\beta$ -caroteno, equinenona,  $\beta$ -criptoxantina, 3-hidroxi equinenona, asteroidenona, cantaxantina, zeaxantina, adonirubina, adonixantina y astaxantina; seleccionar una cepa mutante que tiene una proporción de producto superior (% en masa) de licopeno con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides que la cepa original para proporcionar un microorganismo que produce licopeno; cultivar el microorganismo que produce licopeno; y recoger licopeno o la mezcla de carotenoides que contiene licopeno del cultivo resultante.
- 45 (15) El proceso descrito en el punto (14) anterior, en el que la selección de una cepa mutante que tiene una proporción de producto superior (% en masa) de licopeno con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides que la cepa original es una etapa que comprende seleccionar colonias rosas a violeta rojizas en un medio sólido.
- 50 (16) El proceso descrito en los puntos (14) ó (15) anteriores en el que la proporción del licopeno producido por el microorganismo que produce licopeno es del 40 % en masa o más con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides.
- 55 (17) El proceso descrito en cualquiera de los puntos (14) a (16) anteriores en el que la proporción de cada uno de  $\beta$ -caroteno, equinenona,  $\beta$ -criptoxantina, 3-hidroxi equinenona, asteroidenona, cantaxantina, zeaxantina, adonirubina, adonixantina y astaxantina producida por el microorganismo que produce licopeno es menor del 20 % en masa con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides.
- 60 (18) El proceso descrito en cualquiera de los puntos (14) a (17) anteriores en el que el microorganismo que produce carotenoides se selecciona de una cepa, E-396 (FERM BP-4283) y cepas mutantes de la misma, y una cepa, A-581-1 (FERM BP-4671) y cepas mutantes de la misma.
- 65

La presente invención se describe a continuación en detalle.

5 El proceso de la invención usa, como cepas originales para la mutación, microorganismos que producen astaxantina en los que la secuencia de bases de ADN que corresponde al ARN ribosómico 16S es sustancialmente homóloga a la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 1. Tal como se usa en el presente documento, "sustancialmente homóloga" se refiere a un 98 % o más de homología en consideración de la frecuencia de error y similar en la secuenciación del ADN.

10 Los ejemplos específicos del microorganismo que produce astaxantina que tiene la secuencia sustancialmente homóloga a la secuencia descrita anteriormente pueden incluir una cepa, E-396 (FERM BP-4283) y una cepa, A-581-1 (FERM BP-4671), y diversas cepas mutantes obtenidas mutando y modificando la cepa E-396 o A-581-1 y especies relacionadas con estas dos clases de cepas. La secuencia de bases de ADN de SEQ ID NO: 1  
15 corresponde al ARN ribosómico de la cepa E-396; la secuencia de bases de ADN de SEQ ID NO: 2 al ARN ribosómico de la cepa A-581-1. La homología entre las secuencias de bases de ARN ribosómico 16S de las cepas E-396 y A-581-1 es del 99,4 %, lo que demuestra que son cepas estrechamente relacionadas entre sí. Por tanto, estas cepas forman un grupo como bacterias que producen carotenoides. Las cepas originales para la mutación usadas en el proceso de la invención se definen como bacterias que producen astaxantina que son las cepas E-396 y A-581-1, y mutantes de la cepa E-396 o A-581-1 y especies relacionadas de estas cepas, en las que la secuencia  
20 de bases de ADN que corresponde al ARN ribosómico 16S tiene un 98 % o más de homología con la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 1.

Se describe la cepa E-396 como ejemplo del microorganismo que produce astaxantina usado en la invención. Esta cepa se aisló recientemente por los inventores, y se depositó en el Depositario de Organismos de Patentes Internacionales, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial avanzada ("*National Institute of Advanced Industrial Scientific and Technology*") (Higashi 1-chome 1-banchi 1 chuo dai-6, Tsukuba City, Ibaraki, Japón) con el nombre FERM BP-4283 el 27 de abril de 1993. Además, ejemplos específicos de otros microorganismos pueden incluir la cepa A-581-1. Esta cepa se aisló recientemente por los presentes inventores, y se depositó en el  
25 Depositario de Organismos de Patentes Internacionales, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial avanzada ("*National Institute of Advanced Industrial Scientific and Technology*") con el nombre FERM BP-4671 el 20 de mayo de 1994.

#### Tratamiento por mutación del microorganismo que produce astaxantina y selección de una cepa mutante que produce zeaxantina

35 Un método para someter el microorganismo que produce astaxantina a tratamiento por mutación no está particularmente restringido en la medida en que induzca la mutación del mismo. Por ejemplo, pueden usarse métodos químicos que emplean agentes mutagénicos tales como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) y metanosulfonato de etilo (EMS), métodos físicos tales como irradiación ultravioleta e irradiación con rayos X, métodos biológicos que emplean recombinación génica, transposones y similares. El tratamiento por mutación  
40 puede llevarse a cabo de una vez, o en dos veces o más por ejemplo de la manera en que el tratamiento por mutación se realiza para proporcionar mutantes del microorganismo que produce astaxantina que se someten adicionalmente a tratamiento por mutación.

45 De entre los mutantes del microorganismo que produce astaxantina obtenidos tal como se describió anteriormente, se selecciona entonces una cepa mutante que tiene una proporción de producto superior (% en masa) de zeaxantina con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides que la cepa original para proporcionar el microorganismo que produce zeaxantina. Para este fin, pueden formarse colonias en un medio sólido tras el tratamiento por mutación, seguido por seleccionar al azar colonias, pero preferiblemente se seleccionan colonias  
50 que toman un color de amarillo a naranja en comparación con colonias de rojas a naranja rojizas de la cepa original para obtener eficazmente el microorganismo que produce zeaxantina (mutante) porque las colonias del microorganismo que produce zeaxantina toman a menudo un color de amarillo a naranja. La inclusión de esta etapa mejora drásticamente la probabilidad de poder obtener una cepa mutante que tiene una alta proporción de producto de zeaxantina con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides.

55 Las colonias de cada cepa mutante seleccionada tal como se describió anteriormente se cultivan entonces usando un método convencional y, tras el final del cultivo, se analizan los compuestos carotenoides contenidos en la disolución de cultivo de cada cepa mutante para seleccionar una cepa mutante que tiene una alta proporción de producto de zeaxantina.

60 El cultivo de la cepa mutante puede llevarse a cabo, por ejemplo, en un medio que es necesario para el crecimiento del microorganismo productor y contiene componentes que generan compuestos carotenoides. El método para el cultivo puede ser cualquier método incluyendo cultivo agitado usando tubos de ensayo, matraces y similares, cultivo en agitación con aireación o similares. El método para analizar compuestos carotenoides puede ser cualquier  
65 método si puede separar y detectar compuestos carotenoides; por ejemplo, puede usarse cromatografía de líquidos de alta resolución, cromatografía en capa fina o cromatografía en papel.

Según la presente invención, el microorganismo que produce zeaxantina se obtiene seleccionando una cepa mutante que tiene una alta proporción de producto de zeaxantina basada en la cantidad completa de carotenoides producidos; “la cantidad completa de carotenoides” tal como se usa en el presente documento se refiere a la cantidad total de compuestos carotenoides tales como astaxantina, cantaxantina, adonixantina,  $\beta$ -caroteno, equinenona, zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina, 3-hidroxi equinenona, asteroidenona y adonirubina.

Un microorganismo que produce astaxantina como la cepa E-396 produce simultáneamente muchas clases de compuestos carotenoides tales como astaxantina, cantaxantina, adonixantina,  $\beta$ -caroteno, equinenona, zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina, 3-hidroxi equinenona, asteroidenona y adonirubina. Por tanto, la proporción de producto de zeaxantina con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides es baja, siendo habitualmente del orden del 0 al 10 % en masa. Según la invención, se induce la mutación en un microorganismo que produce astaxantina, seguido por la selección de una cepa mutante que tiene una proporción de producto de zeaxantina particularmente alta con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides. Los criterios para la selección requieren al menos que la proporción de producto de zeaxantina tras la mutación sea superior a la de zeaxantina en la cepa original; se selecciona una cepa mutante en la que la proporción de la zeaxantina producida con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides es del 20 % en masa o más, más preferiblemente del 40 % en masa o más e incluso más preferiblemente del 60 % en masa o más.

Se estima que la biosíntesis de astaxantina usa  $\beta$ -caroteno al principio de la ruta, y tiene lugar modificando los anillos de 6 miembros en ambos extremos de los mismos empleando una enzima para la cetonzación y una hidrolasa, respectivamente (véase la figura 1). Se estima que la deficiencia completa de la enzima para la cetonzación conduce a la producción de sólo  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina y zeaxantina y no proporciona producción de equinenona, cantaxantina, 3-hidroxi equinenona, asteroidenona, adonirubina, adonixantina y astaxantina, que requieren la enzima para la cetonzación. Se estima que la deficiencia incompleta de la enzima para la cetonzación produce proporciones disminuidas de equinenona, cantaxantina, 3-hidroxi equinenona, asteroidenona, adonirubina, adonixantina y astaxantina basadas en la cantidad completa de carotenoides. Por tanto, como otro medio útil para seleccionar el microorganismo que produce zeaxantina de entre las cepas mutantes, puede usarse un método en el que la selección se lleva a cabo basándose en las proporciones disminuidas de equinenona, cantaxantina, 3-hidroxi equinenona, asteroidenona, adonirubina, adonixantina y astaxantina basadas en la cantidad completa de carotenoides. La selección puede realizarse basándose en que la proporción de cada uno de los compuestos descritos anteriormente con respecto a los carotenoides totales es inferior al 10 % en masa, preferiblemente inferior al 5 % en masa y más preferiblemente inferior al 1 % en masa.

#### Tratamiento por mutación del microorganismo que produce carotenoides y selección de una cepa mutante que produce $\beta$ -caroteno

La cepa original para la mutación tal como se usa en este método se define como un microorganismo que produce carotenoides en el que la secuencia de bases de ADN que corresponde al ARN ribosómico 16S tiene un 98 % o más de homología con la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 1 y que produce al menos un compuesto carotenoide seleccionado de equinenona,  $\beta$ -criptoxantina, 3-hidroxi equinenona, asteroidenona, cantaxantina, zeaxantina, adonirubina, adonixantina y astaxantina; preferiblemente, se usa un microorganismo que produce carotenoides que tiene una proporción de la cantidad de producción combinada de cantaxantina y equinenona con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides del 50 % en masa o más, o una proporción de la cantidad de producción combinada de zeaxantina y  $\beta$ -criptoxantina con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides del 50 % en masa o más. Más preferiblemente, se usa un microorganismo que produce carotenoides que tiene una proporción de la cantidad de producción combinada de cantaxantina y equinenona con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides del 70 % en masa o más, o una proporción de la cantidad de producción combinada de zeaxantina y  $\beta$ -criptoxantina con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides del 70 % en masa o más. Tal como se usa en el presente documento, “la cantidad completa de carotenoides” se refiere a la cantidad total de carotenoides tales como  $\beta$ -caroteno, equinenona,  $\beta$ -criptoxantina, 3-hidroxi equinenona, asteroidenona, cantaxantina, zeaxantina, adonirubina, adonixantina y astaxantina.

En la biosíntesis de carotenoides, se estima que se forman anillos en ambos extremos del licopeno para generar  $\beta$ -caroteno cuyos anillos de 6 miembros en ambos extremos se modifican adicionalmente mediante una enzima para la cetonzación y una hidroxilasa, respectivamente para producir cantaxantina, zeaxantina, astaxantina y similares (véase la figura 1).

Los presentes inventores han encontrado que la probabilidad de poder obtener microorganismos que producen  $\beta$ -caroteno mejora drásticamente usando, como cepa original para la mutación, un microorganismo que produce cantaxantina y equinenona a altas proporciones o un microorganismo que produce zeaxantina y  $\beta$ -criptoxantina a altas proporciones, en comparación con usar un microorganismo que produce astaxantina a una alta proporción como cepa original para la mutación. Estos fenómenos pueden explicarse tal como sigue. Aunque las enzimas para hidrolizar y cetonzar  $\beta$ -caroteno tienen que deleccionarse con el fin de acumular  $\beta$ -caroteno para el microorganismo

que produce carotenoides que produce astaxantina a una alta proporción porque el microorganismo combina ambas enzimas, simplemente sólo la enzima para la cetonzación tiene que deleccionarse a través de mutación para el microorganismo que produce la cantidad total de cantaxantina y equinenona a una alta proporción porque tiene la hidroxilasa deleccionada, o simplemente sólo tiene que deleccionarse la hidroxilasa para el microorganismo que produce la cantidad total de zeaxantina y  $\beta$ -criptoxantina a una alta proporción porque tiene la enzima para la cetonzación deleccionada. Un microorganismo que produce la cantidad total de cantaxantina y equinenona a una alta proporción, y un microorganismo que produce la cantidad total de zeaxantina y  $\beta$ -criptoxantina a una alta proporción pueden ser cepas de tipo natural que tienen de manera natural tales propiedades, pero también pueden obtenerse a través de mutación, por ejemplo a partir del microorganismo que produce astaxantina.

El método para someter el microorganismo que produce carotenoides a tratamiento por mutación no está particularmente restringido en la medida en que induzca mutación. Por ejemplo, pueden usarse métodos químicos que emplean agentes mutagénicos tales como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) y metanosulfonato de etilo (EMS), métodos físicos tales como irradiación ultravioleta e irradiación con rayos X, métodos biológicos que emplean recombinación génica, transposones y similares. El tratamiento por mutación puede llevarse a cabo de una vez, o en dos veces o más por ejemplo de la manera en que el tratamiento por mutación se realiza para proporcionar mutantes del microorganismo que produce carotenoides que se someten adicionalmente a tratamiento por mutación.

De entre los mutantes del microorganismo que produce carotenoides obtenidos tal como se describió anteriormente, se selecciona entonces una cepa mutante que tiene una proporción de producto superior (% en masa) de  $\beta$ -caroteno con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides que la cepa original para proporcionar un microorganismo que produce  $\beta$ -caroteno. Para este fin, pueden formarse colonias en un medio sólido tras el tratamiento por mutación, seguido por selección al azar colonias, aunque se seleccionan colonias que toman un color de amarillo a naranja para recoger eficazmente el microorganismo que produce  $\beta$ -caroteno (mutante) porque las colonias del microorganismo que produce  $\beta$ -caroteno toman a menudo tales colores. La inclusión de esta etapa mejora drásticamente la probabilidad de poder obtener una cepa mutante que tiene una alta proporción de producto de  $\beta$ -caroteno con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides.

Las colonias de cada cepa mutante seleccionada tal como se describió anteriormente pueden cultivarse entonces usando un método convencional, y pueden analizarse los compuestos carotenoides contenidos en la disolución de cultivo de cada cepa mutante para seleccionar una cepa mutante que tiene una alta proporción de producto de  $\beta$ -caroteno.

El cultivo de la cepa mutante puede llevarse a cabo, por ejemplo, en un medio que es necesario para el crecimiento del microorganismo productor y contiene componentes que generan compuestos carotenoides. El método para el cultivo puede ser cualquier método incluyendo cultivo agitado usando tubos de ensayo, matraces o similares, cultivo en agitación con aireación y similares. El método para analizar los compuestos carotenoides puede ser cualquier método si puede separar y detectar compuestos carotenoides; por ejemplo, puede usarse cromatografía de líquidos de alta resolución, cromatografía en capa fina o cromatografía en papel.

El microorganismo que produce  $\beta$ -caroteno se obtiene seleccionando una cepa mutante que tiene una alta proporción de producto de  $\beta$ -caroteno basada en la cantidad completa de carotenoides. Un microorganismo que produce carotenoides como la cepa E-396 produce simultáneamente muchas clases de compuestos carotenoides tales como astaxantina, cantaxantina, adonixantina,  $\beta$ -caroteno, equinenona, zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina, 3-hidroxi equinenona, asteroidenona y adonirubina. Por tanto, la proporción de producto de  $\beta$ -caroteno basada en la cantidad completa de carotenoides es baja, siendo habitualmente del orden del 0 al 20 % en masa.

Se induce la mutación en el microorganismo que produce carotenoides, seguido por la selección de una cepa mutante que tiene una proporción de producto de  $\beta$ -caroteno particularmente alta con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides. Los criterios para la selección al menos requieren que la proporción de producto de  $\beta$ -caroteno en la cepa mutante sea superior a la de  $\beta$ -caroteno en la cepa original; se selecciona una cepa mutante en la que la proporción de producto de  $\beta$ -caroteno con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides es preferiblemente del 50 % en masa o más, más preferiblemente del 70 % en masa o más, e incluso más preferiblemente del 90 % en masa o más.

Se estima que la biosíntesis de carotenoides, tal como se describió anteriormente, tiene lugar modificando los anillos de 6 miembros en ambos extremos de los mismos usando una enzima para la cetonzación y una hidroxilasa, respectivamente para producir cantaxantina, zeaxantina, astaxantina y similares (véase la figura 1). Se estima que la deficiencia completa de la enzima para la cetonzación y la hidroxilasa conduce a la producción de compuestos sólo hasta  $\beta$ -caroteno y no proporciona producción de equinenona,  $\beta$ -criptoxantina, 3-hidroxi equinenona, asteroidenona, cantaxantina, zeaxantina, adonirubina, adonixantina y astaxantina posterior a  $\beta$ -caroteno. Se estima que la deficiencia incompleta de la enzima para la cetonzación y la hidroxilasa aumenta la proporción de producto de  $\beta$ -caroteno y produce proporciones disminuidas de equinenona,  $\beta$ -criptoxantina, 3-hidroxi equinenona, asteroidenona, cantaxantina, zeaxantina, adonirubina, adonixantina y astaxantina basadas en la cantidad completa de carotenoides.

Por tanto, como otro medio útil para seleccionar el microorganismo que produce  $\beta$ -caroteno de entre las cepas mutantes, puede usarse un método en el que la selección se lleva a cabo basándose en las proporciones disminuidas de equinenona,  $\beta$ -criptoxantina, 3-hidroxi equinenona, asteroidenona, cantaxantina, zeaxantina, adonirubina, adonixantina y astaxantina basadas en la cantidad completa de carotenoides. La selección puede realizarse basándose en que la proporción de cada uno de los compuestos descritos anteriormente con respecto a los carotenoides totales es inferior al 20 % en masa, preferiblemente inferior al 10 % en masa y más preferiblemente inferior al 5 % en masa.

#### Tratamiento por mutación de un microorganismo que produce carotenoides y selección de una cepa mutante que produce licopeno

La cepa original para la mutación usada en este método se define como un microorganismo que produce carotenoides en el que la secuencia de bases de ADN que corresponde al ARN ribosómico 16S tiene un 98 % o más de homología con la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 1 y que produce al menos un compuesto carotenoide seleccionado de  $\beta$ -caroteno, equinenona,  $\beta$ -criptoxantina, 3-hidroxi equinenona, asteroidenona, cantaxantina, zeaxantina, adonirubina, adonixantina y astaxantina. Puede usarse una cepa de tipo natural que produce al menos uno de los carotenoides descritos anteriormente como cepa original para la mutación, aunque también puede emplearse una cepa mutante que tiene la productividad de astaxantina, cantaxantina, zeaxantina,  $\beta$ -caroteno o similares mejorada mediante tratamiento por mutación artificial como cepa original.

Un método para someter el microorganismo que produce carotenoides a tratamiento por mutación no está particularmente restringido en la medida en que induzca mutación. Por ejemplo, pueden usarse métodos químicos que emplean agentes mutagénicos tales como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) y metanosulfonato de etilo (EMS), métodos físicos tales como irradiación ultravioleta e irradiación con rayos X, métodos biológicos que emplean recombinación génica, transposones y similares. El tratamiento por mutación puede llevarse a cabo de una vez, o en dos veces o más por ejemplo de la manera en que el tratamiento por mutación se realiza para proporcionar mutantes del microorganismo que produce carotenoides que se someten adicionalmente a tratamiento por mutación.

De entre los mutantes del microorganismo que produce carotenoides obtenido tal como se describió anteriormente, se selecciona entonces una cepa mutante que tiene una proporción de producto superior (% en masa) de licopeno con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides que la cepa original para proporcionar el microorganismo que produce licopeno. Para este fin, pueden formarse colonias en un medio sólido tras el tratamiento por mutación, seguido por seleccionar al azar colonias, aunque se seleccionan colonias que toman un color rosa a violeta rojizo en comparación con colonias de color rojo a anaranjado de la cepa original para recoger eficazmente el microorganismo que produce licopeno (mutante) porque las colonias del microorganismo que produce licopeno toman a menudo un color rosa a violeta rojizo. La inclusión de esta etapa mejora drásticamente la probabilidad de poder obtener una cepa mutante que tiene una alta proporción de producto de licopeno con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides.

Las colonias de cada cepa mutante seleccionadas tal como se describió anteriormente pueden cultivarse entonces usando un método convencional, y los compuestos carotenoides contenidos en la disolución de cultivo de cada cepa mutante pueden analizarse para seleccionar una cepa mutante que tiene una alta proporción de producto de licopeno.

El cultivo de la cepa mutante puede llevarse a cabo, por ejemplo, en un medio que es necesario para el crecimiento del microorganismo productor y contiene componentes que generan compuestos carotenoides. El método para el cultivo puede ser cualquier método incluyendo cultivo agitado usando tubos de ensayo, matraces o similares, cultivo en agitación con aireación y similares. El método para analizar los compuestos carotenoides puede ser cualquier método si puede separar y detectar compuestos carotenoides; por ejemplo, puede usarse cromatografía de líquidos de alta resolución, cromatografía en capa fina o cromatografía en papel.

El microorganismo que produce licopeno se obtiene seleccionando una cepa mutante que tiene una alta proporción de producto de licopeno con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides; "la cantidad completa de carotenoides" tal como se usa en el presente documento se refiere a la cantidad total de carotenoides tales como licopeno,  $\beta$ -caroteno, equinenona,  $\beta$ -criptoxantina, 3-hidroxi equinenona, asteroidenona, cantaxantina, zeaxantina, adonirubina, adonixantina y astaxantina.

Un microorganismo que produce carotenoides como la cepa E-396 produce simultáneamente muchas clases de compuestos carotenoides tales como astaxantina, cantaxantina, adonixantina,  $\beta$ -caroteno, equinenona, zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina, 3-hidroxi equinenona, asteroidenona y adonirubina. Por tanto, la proporción de producto de licopeno con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides es baja, siendo habitualmente del orden del 0 al 5 % en masa.

Se induce la mutación en un microorganismo que produce carotenoides, seguido por la selección de una cepa mutante que tiene una proporción de producto de licopeno particularmente alta con respecto a la cantidad de

producción completa de carotenoides. Los criterios para la selección requieren al menos que la proporción de producto de licopeno en la cepa mutante sea superior a la de licopeno en la cepa original; se selecciona una cepa mutante en la que la proporción de producto de licopeno con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides es preferiblemente del 40 % en masa o más, más preferiblemente del 65 % en masa o más, e incluso más preferiblemente del 90 % en masa o más.

Se estima que la biosíntesis de carotenoides tiene lugar formando anillos en ambos extremos del licopeno para generar  $\beta$ -caroteno cuyos anillos de 6 miembros en ambos extremos se modifican además por una enzima para la cetonización y una hidroxilasa, respectivamente para producir cantaxantina, zeaxantina, astaxantina y similares (véase la figura 1). Se estima que la deficiencia completa de la ciclasa conduce a la producción de sólo licopeno y no proporciona producción de  $\beta$ -caroteno, equinenona,  $\beta$ -criptoxantina, 3-hidroxi equinenona, asteroidenona, cantaxantina, zeaxantina, adonirubina, adonixantina y astaxantina posterior al licopeno. Se estima que la deficiencia incompleta de la ciclasa aumenta la proporción de producto de licopeno y produce proporciones disminuidas de  $\beta$ -caroteno, equinenona,  $\beta$ -criptoxantina, 3-hidroxi equinenona, asteroidenona, cantaxantina, zeaxantina, adonirubina, adonixantina y astaxantina basadas en la cantidad completa de carotenoides. Por tanto, como otro medio útil para seleccionar el microorganismo que produce licopeno de entre las cepas mutantes, puede usarse un método en el que la selección se lleva a cabo basándose en las proporciones disminuidas de  $\beta$ -caroteno, equinenona,  $\beta$ -criptoxantina, 3-hidroxi equinenona, asteroidenona, cantaxantina, zeaxantina, adonirubina, adonixantina y astaxantina basadas en la cantidad completa de carotenoides. La selección puede realizarse basándose en que la proporción de cada uno de los compuestos descritos anteriormente con respecto a los carotenoides totales es inferior al 20 % en masa, preferiblemente inferior al 10 % en masa y más preferiblemente inferior al 5 % en masa.

#### Cultivo de las cepas mutantes seleccionadas y recogida de compuestos carotenoides

Entonces, la cepa mutante que produce zeaxantina, la cepa mutante que produce  $\beta$ -caroteno o la cepa mutante que produce licopeno seleccionada tal como se describió anteriormente se cultiva tal como se establece a continuación, seguido por la recogida de un compuesto carotenoide deseado.

Cada uno de los microorganismos mutantes descritos anteriormente se cultiva con el fin de recoger zeaxantina,  $\beta$ -caroteno, licopeno o una mezcla de carotenoides que contienen los mismos. El método para cultivar tales microorganismos mutantes puede ser cualquier método, siempre que se produzcan los compuestos carotenoides deseados, sin embargo pueden emplearse los siguientes métodos. Es decir, el medio usado contiene una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, sales inorgánicas y, si es necesario, sustancias según la demanda particular (por ejemplo vitaminas, aminoácidos, ácidos nucleicos y similares) que se requieren para el crecimiento de los microorganismos productores. Los ejemplos de la fuente de carbono incluyen sacáridos tales como glucosa, sacarosa, fructosa, trehalosa, manosa, manitol y maltosa, ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido fumárico, ácido cítrico, ácido propiónico, ácido málico y ácido malónico, alcoholes tales como etanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol e isobutanol, y similares. La proporción de adición varía, dependiendo del tipo de fuente de carbono usada, pero es normalmente de 1 a 100 g, preferiblemente de 2 a 50 g por l del medio. Los ejemplos de la fuente de nitrógeno usada incluyen una o más seleccionadas del grupo que consiste en nitrato de potasio, nitrato de amonio, cloruro de amonio, sulfato de amonio, fosfato de amonio, amoniaco, urea, glutamato monosódico y similares. La proporción de adición varía, dependiendo del tipo de fuente de nitrógeno usada, pero es normalmente de 0,1 a 20 g, preferiblemente de 1 a 10 g por l del medio. Los ejemplos de la sal inorgánica usada incluyen una o más clases de dihidrogenofosfato de potasio, hidrogenofosfato de dipotasio, hidrogenofosfato de disodio, sulfato de magnesio, cloruro de magnesio, sulfato de hierro, cloruro de hierro, sulfato de manganeso, cloruro de manganeso, sulfato de zinc, cloruro de zinc, sulfato de cobre, cloruro de calcio, carbonato de calcio y carbonato de sodio. La proporción de adición varía, dependiendo del tipo de sal inorgánica usada, pero es normalmente de 0,1 mg a 10 g por l del medio. Los ejemplos de sustancia según la demanda particular usada incluyen una o más clases de vitaminas, ácidos nucleicos, extracto de levadura, peptona, extracto de carne, extracto de malta, licor de maceración del maíz, levadura secada, desechos de soja, aceite de semilla de soja, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de linaza. La proporción de adición varía, dependiendo del tipo de sustancia según la demanda particular, pero es normalmente de 0,01 mg a 100 g por l del medio. El pH del medio se ajusta a de 2 a 12, preferiblemente de 6 a 9. La condición de cultivo comprende una temperatura de 10 a 70 °C, preferiblemente de 20 a 35 °C; el cultivo agitado o cultivo en agitación con aireación se realiza normalmente durante de 1 a 20 días, preferiblemente de 2 a 9 días.

Entonces, se lleva a cabo una operación para eliminar el agua de la disolución de cultivo obtenida tal como se describió anteriormente. Depende de condiciones tales como el contenido en materia colorante de la disolución de cultivo hasta qué grado debe eliminar el agua de la disolución de cultivo con el fin de obtener zeaxantina,  $\beta$ -caroteno, licopeno o una mezcla de carotenoides que contienen los mismos, pero normalmente, se lleva a cabo en primer lugar una operación de filtración y, si es necesaria una eliminación de agua adicional, se seca el precipitado. El método para la filtración puede realizarse usando centrifugación o filtración convencional, o similares. Si es necesaria una eliminación de agua adicional, puede adoptarse un método para secar el precipitado. Los ejemplos del método de secado incluyen, por ejemplo, secado por pulverización, secado en tambor y secado por congelación convencionales.

El contenido de un compuesto carotenoide deseado puede aumentarse opcionalmente mediante extracción. Un material de partida para la extracción puede usar la propia disolución de cultivo, o puede emplear el precipitado tras la filtración o la materia secada del mismo. Los ejemplos del método de extracción incluyen, por ejemplo, extracción con disolvente y extracción con dióxido de carbono supercrítico. Un disolvente orgánico tal como se usa para la extracción no está particularmente restringido, y puede ser un disolvente orgánico soluble en agua o un disolvente orgánico insoluble en agua. Los ejemplos del disolvente orgánico soluble en agua incluyen tetrahidrofurano, piridina, dioxano, ciclohexano, ciclohexanol, metanol, etanol, isopropanol, acetona, etilmetilcetona, dimetilformamida y dimetilsulfóxido. Los disolventes de extracción pueden usarse como una mezcla de dos clases o más, o mezclando con agua. El extracto resultante puede someterse a concentración a vacío o similar para eliminar el disolvente para preparar un producto. Opcionalmente, puede llevarse a cabo un tratamiento de desodorización o suspensión en aceite vegetal.

Cuando se requiere que el contenido de un compuesto carotenoide deseado se aumente adicionalmente, se recomienda que la purificación se realice usando medios de purificación convencionales incluyendo extracción líquido-líquido empleando una combinación de dos o más clases de disolventes y cromatografía en columna, seguido por concentración o enfriamiento de un extracto o un eluato o similar que contiene el compuesto carotenoide, o adición de un disolvente malo para precipitar el compuesto carotenoide.

Los precipitados de cultivo, precipitados secados, extractos, extractos purificados y similares que contienen la zeaxantina,  $\beta$ -caroteno o licopeno, obtenidos mediante estos métodos, pueden usarse, por ejemplo como componentes de composición para piensos, materiales alimenticios, materiales cosméticos y materiales farmacéuticos:

#### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama que muestra la ruta biosintética de compuestos carotenoides.

#### Mejor modo de llevar a cabo la invención

##### Ejemplos

La presente invención se describe a continuación con más detalle, basándose en ejemplos. Sin embargo, no se pretende que la invención se limite sólo a esos ejemplos.

##### Ejemplo 1

Se sometió una cepa, E-396, (FERM BP-4283) a un tratamiento de mutación con 200 mg/l de NTG (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina) permaneciendo a una temperatura de 28 °C durante 30 minutos. En un tubo de ensayo con un diámetro interior de 18 mm se colocaron 6 ml de un medio que comprendía la composición mostrada en la tabla 1, que entonces se sometió a esterilización por vapor a 121 °C durante 15 minutos para preparar un medio de tubo de ensayo. Se seleccionaron 200 colonias mutantes que tomaban color de amarillo a naranja, cada una de las cuales se inoculó entonces, en una cantidad de un bucle de platino, en el medio de tubo de ensayo y se sometió a cultivo con agitación alternante a 330 rpm y 28 °C durante 4 días. Entonces se sometieron estos cultivos a separación por centrifugación, seguido por análisis de compuestos carotenoides en los cuerpos celulares resultantes usando cromatografía de líquidos de alta resolución, con el resultado de proporcionar una cepa que tenía una proporción de producto del 60 % en masa o más de zeaxantina con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides. Los resultados del análisis de compuestos carotenoides contenidos en esta cepa se muestran en la tabla 2. Con fines de comparación, los resultados del análisis de compuestos carotenoides en una disolución de cultivo en la que se cultivó la cepa E-396 en las mismas condiciones que las descritas anteriormente se muestran en la tabla 3.

[Tabla 1]

| Composición   | Cantidad añadida (g/l) |
|---|------------------------|
| extracto de levadura                                | 20                     |
| peptona   | 5                      |
| sacarosa  | 50                     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 1,5                    |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 3,8                    |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 0,5                    |
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 0,01                   |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                | 0,01                   |

## ES 2 387 674 T3

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

una cantidad a la que el medio se vuelve a pH 7

[Tabla 2]

| Compuesto carotenoide | Concentración de producto por unidad de volumen de cultivo (mg/l) | Proporción de producto (% en masa) |
|-----------------------|---|------------------------------------|
| β-caroteno            | 4,0   | 23,5                               |
| equinenona            | -   |                                    |
| 3-hidroxi equinenona  | -   |                                    |
| cantaxantina          | -   |                                    |
| adonirubina           | -   |                                    |
| β-criptoxantina       | 2,4   | 14,1                               |
| astaxantina           | -   |                                    |
| asteroidenona         | -   |                                    |
| adonixantina          | -   |                                    |
| zeaxantina            | 10,6  | 62,4                               |

“-” muestra por debajo del límite de detección (0,1 mg/l).

[Tabla 3]

| Compuesto carotenoide | Concentración de producto por unidad de volumen de cultivo (mg/l) | Proporción de producto (% en masa) |
|-----------------------|---|------------------------------------|
| β-caroteno            | 1,6   | 6,6                                |
| equinenona            | 1,8   | 7,4                                |
| 3-hidroxi equinenona  | 0,4   | 1,6                                |
| cantaxantina          | 1,6   | 6,6                                |
| adonirubina           | 1,0   | 4,1                                |
| β-criptoxantina       | -   |                                    |
| astaxantina           | 6,4   | 26,3                               |
| asteroidenona         | 1,5   | 6,2                                |
| adonixantina          | 8,6   | 35,4                               |
| zeaxantina            | 1,4   | 5,8                                |

“-” muestra por debajo del límite de detección (0,1 mg/l).

5

### Ejemplo 2

Se sometió una cepa, E-396 (FERM BP-4283), a un tratamiento de mutación con 200 mg/l de NTG (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina) permaneciendo a una temperatura de 28 °C durante 30 minutos. En un tubo de ensayo con un diámetro interior de 18 mm se colocaron 6 ml de un medio que comprendía la composición mostrada en la tabla 1 que entonces se sometió a esterilización por vapor a 121 °C durante 15 minutos para preparar un medio de tubo de ensayo. Se seleccionaron aleatoriamente 1.500 colonias mutantes, cada una de las cuales se inoculó entonces, en una cantidad de un bucle de platino, en el medio de tubo de ensayo y se sometió a cultivo con agitación alternante a 330 rpm y 28 °C durante 4 días. Entonces se sometieron estos cultivos a separación por centrifugación, seguido por análisis de compuestos carotenoides en los cuerpos celulares resultantes usando cromatografía de líquidos de alta resolución, con el resultado de proporcionar una cepa que tenía una proporción de producto inferior al 10 % en masa de cada una de equinenona, cantaxantina, 3-hidroxi equinenona, asteroidenona, adonirubina, adonixantina y astaxantina producidas con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides. Los resultados del análisis de compuestos carotenoides en esta cepa se muestran en la tabla 4.

10

15

[Tabla 4]

| Compuesto carotenoide  | Concentración de producto por unidad de volumen de cultivo (mg/l) | Proporción de producto (% en masa) |
|------------------------|---|------------------------------------|
| $\beta$ -caroteno      | 4,4   | 31,9                               |
| equinenona             | -   |                                    |
| 3-hidroxi equinenona   | -   |                                    |
| cantaxantina           | -   |                                    |
| adonirubina            | 0,2   | 1,4                                |
| $\beta$ -criptoxantina | 3,1   | 22,5                               |
| astaxantina            | 0,5   | 3,6                                |
| asteroidenona          | -   |                                    |
| adonixantina           | 1,1   | 8,0                                |
| zeaxantina             | 4,5   | 32,6                               |

“-” muestra por debajo del límite de detección (0,1 mg/l).

## Ejemplo 3

- 5 Se sometió una cepa, E-396 (FERM BP-4283), a un tratamiento de mutación con NTG, seguido por selección de colonias que tenían un tono de color oscuro de rojo para proporcionar una cepa mutante, Y-559, que tenía una productividad mejorada de astaxantina. Se sometió adicionalmente la cepa Y-559 a un tratamiento de mutación con 150 mg/l de NTG. En un tubo de ensayo con un diámetro interior de 18 mm se colocaron 6 ml de un medio que comprendía la composición mostrada en la tabla 1 que entonces se sometió a esterilización por vapor a 121 °C
- 10 durante 15 minutos para preparar un medio de tubo de ensayo. Se seleccionaron 350 colonias mutantes que tomaban color de amarillo a naranja, cada una de las cuales se inoculó entonces, en una cantidad de un bucle de platino, en el medio de tubo de ensayo y se sometió a cultivo con agitación alternante a 330 rpm y 28 °C durante 5 días. Entonces se sometieron estos cultivos a separación por centrifugación, seguido por análisis de compuestos carotenoides en los cuerpos celulares resultantes usando cromatografía de líquidos de alta resolución, con el
- 15 resultado de proporcionar una cepa que tenía una proporción de producto inferior al 1 % de cada uno de equinenona, cantaxantina, 3-hidroxi equinenona, asteroidenona, adonirubina, adonixantina y astaxantina con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides. Los resultados del análisis de compuestos carotenoides en esta cepa se muestran en la tabla 5. Para fines de comparación, los resultados del análisis de compuestos carotenoides en una disolución de cultivo en la que se cultivó la cepa Y- 559 en las mismas condiciones
- 20 que las descritas anteriormente se muestran en la tabla 6.

[Tabla 5]

| Compuesto carotenoide  | Concentración de producto por unidad de volumen de cultivo (mg/l) | Proporción de producto (% en masa) |
|------------------------|---|------------------------------------|
| $\beta$ -caroteno      | 34,0  | 59,1                               |
| equinenona             | -   |                                    |
| 3-hidroxi equinenona   | -   |                                    |
| cantaxantina           | -   |                                    |
| adonirubina            | -   |                                    |
| $\beta$ -criptoxantina | 3,4   | 5,9                                |
| astaxantina            | -   |                                    |
| asteroidenona          | -   |                                    |
| adonixantina           | 0,4   | 0,7                                |
| zeaxantina             | 19,7  | 34,3                               |

“-” muestra por debajo del límite de detección (0,1 mg/l).

[Tabla 6]

| Compuesto carotenoide  | Concentración de producto por unidad de volumen de cultivo (mg/l) | Proporción de producto (% en masa) |
|------------------------|---|------------------------------------|
| $\beta$ -caroteno      | 26,2  | 13,6                               |
| equinenona             | 7,9   | 4,1                                |
| 3-hidroxi equinenona   | 0,9   | 0,5                                |
| cantaxantina           | 12,0  | 6,3                                |
| adonirubina            | 20,3  | 10,6                               |
| $\beta$ -criptoxantina | -   |                                    |
| astaxantina            | 67,7  | 35,3                               |
| asteroidenona          | -   |                                    |
| adonixantina           | 56,4  | 29,4                               |
| zeaxantina             | 0,6   | 0,3                                |

"-" muestra por debajo del límite de detección (0,1 mg/l).

## Ejemplo 4

- 5 Se sometió una cepa, A-581-1 (FERM BP-4671) a un tratamiento de mutación con irradiación ultravioleta usando una lámpara de UV. En un tubo de ensayo con un diámetro interior de 18 mm se colocaron 6 ml de un medio que comprendía la composición mostrada en la tabla 1 que entonces se sometió a esterilización por vapor a 121 °C durante 15 minutos para preparar un medio de tubo de ensayo. Se seleccionaron 280 colonias mutantes que tomaban color de amarillo a naranja, cada una de las cuales se inoculó entonces, en una cantidad de un bucle de platino, en el medio de tubo de ensayo y se sometió a cultivo con agitación alternante a 330 rpm y 28 °C durante 4 días. Entonces se sometieron estos cultivos a separación por centrifugación, seguido por análisis de compuestos carotenoides en los cuerpos celulares resultantes usando cromatografía de líquidos de alta resolución, con el resultado de proporcionar una cepa que tenía una proporción de producto del 20 % en masa o más de zeaxantina con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides. Los resultados del análisis de compuestos carotenoides en esta cepa se muestran en la tabla 7. Para fines de comparación, los resultados del análisis de compuestos carotenoides en una disolución de cultivo en la que se cultivó la cepa A-581-1 en las mismas condiciones que las descritas anteriormente se muestran en la tabla 8.

[Tabla 7]

| Compuesto carotenoide  | Concentración de producto por unidad de volumen de cultivo (mg/l) | Proporción de producto (% en masa) |
|------------------------|---|------------------------------------|
| $\beta$ -caroteno      | 3,9   | 48,1                               |
| equinenona             | -   |                                    |
| 3-hidroxi equinenona   | -   |                                    |
| cantaxantina           | -   |                                    |
| adonirubina            | -   |                                    |
| $\beta$ -criptoxantina | 2,2   | 27,2                               |
| astaxantina            | -   |                                    |
| asteroidenona          | -   |                                    |
| adonixantina           | -   |                                    |
| zeaxantina             | 2,0   | 24,7                               |

"-" muestra por debajo del límite de detección (0,1 mg/l).

[Tabla 8]

| Compuesto carotenoide  | Concentración de producto por unidad de volumen de cultivo (mg/l) | Proporción de producto (% en masa) |
|------------------------|---|------------------------------------|
| $\beta$ -caroteno      | 0,6   | 7,8                                |
| equinenona             | 0,6   | 7,8                                |
| 3-hidroxi equinenona   | -   |                                    |
| cantaxantina           | 0,7   | 9,1                                |
| adonirubina            | 0,4   | 5,2                                |
| $\beta$ -criptoxantina | -   |                                    |
| astaxantina            | 1,8   | 23,4                               |
| asteroidenona          | 0,4   | 5,2                                |
| adonixantina           | 2,7   | 35,1                               |
| zeaxantina             | 0,5   | 6,5                                |

"-" muestra por debajo del límite de detección (0,1 mg/l).

## Ejemplo 5 (comparativo)

- 5 Se sometió una cepa, E-396 (FERM BP-4283), a un tratamiento de mutación con 100 mg/l de NTG (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina) permaneciendo a una temperatura de 28 °C durante 30 minutos. En un tubo de ensayo con un diámetro interior de 18 mm se colocaron 6 ml de un medio que comprendía la composición mostrada en la tabla 9 que entonces se sometió a esterilización por vapor a 121 °C durante 15 minutos para preparar un medio de tubo de ensayo. Se seleccionaron 4.000 colonias mutantes que tomaban color de amarillo a naranja, cada una de las cuales
- 10 se inoculó entonces, en una cantidad de un bucle de platino, en el medio de tubo de ensayo y se sometió a cultivo con agitación alternante a 330 rpm y 28 °C durante 4 días. Entonces se sometieron estos cultivos a separación por centrifugación, seguido por análisis de compuestos carotenoides en los cuerpos celulares resultantes usando cromatografía de líquidos de alta resolución, con el resultado de proporcionar una cepa que tenía una proporción de producto del 50 % en masa o más de  $\beta$ -caroteno con respecto a la cantidad de producción completa de
- 15 carotenoides. Los resultados del análisis de compuestos carotenoides en esta cepa se muestran en la tabla 10. Para fines de comparación, los resultados del análisis de compuestos carotenoides en una disolución de cultivo en la que se cultivó la cepa E-396 en las mismas condiciones que las descritas anteriormente se muestran en la tabla 11.

[Tabla 9]

| Composición   | Cantidad añadida (g/l)                          |
|---|---|
| extracto de levadura                                | 20  |
| peptona   | 5   |
| sacarosa  | 50  |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                            | 1,5   |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 3,8   |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$           | 0,5   |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$           | 0,01  |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$           | 0,01  |
| $\text{Na}_2\text{CO}_3$                            | una cantidad a la que el medio se vuelve a pH 7 |

20

[Tabla 10]

| Compuesto carotenoide | Concentración de producto por unidad de volumen de cultivo (mg/l) | Proporción de producto (% en masa) |
|-----------------------|---|------------------------------------|
| $\beta$ -caroteno     | 11,9  | 85,0                               |
| equinenona            | 0,2   | 1,4                                |
| 3-hidroxi equinenona  | -   |                                    |

|                        |     |     |
|------------------------|-----|-----|
| cantaxantina           | 0,3 | 2,1 |
| adonirubina            | 0,4 | 2,9 |
| $\beta$ -criptoxantina | -   |     |
| astaxantina            | 0,7 | 5,0 |
| asteroidenona          | -   |     |
| adonixantina           | 0,5 | 3,6 |
| zeaxantina             | -   |     |

"-" muestra por debajo del límite de detección (0,1 mg/l).

[Tabla 11]

| Compuesto carotenoide  | Concentración de producto por unidad de volumen de cultivo (mg/l) | Proporción de producto (% en masa) |
|------------------------|---|------------------------------------|
| $\beta$ -caroteno      | 1,6   | 6,6                                |
| equinenona             | 1,8   | 7,4                                |
| 3-hidroxi-equinenona   | 0,4   | 1,6                                |
| cantaxantina           | 1,6   | 6,6                                |
| adonirubina            | 1,0   | 4,1                                |
| $\beta$ -criptoxantina | -   |                                    |
| astaxantina            | 6,4   | 26,3                               |
| asteroidenona          | 1,5   | 6,2                                |
| adonixantina           | 8,6   | 35,4                               |
| zeaxantina             | 1,4   | 5,8                                |

"-" muestra por debajo del límite de detección (0,1 mg/l).

#### Ejemplo 6 (comparativo)

5 Se sometió una cepa, E-396 (FERM BP-4283), a un tratamiento de mutación con NTG, seguido por la selección de colonias de color naranja para proporcionar una cepa mutante, CA-22, que tenía una productividad mejorada de cantaxantina. Se sometió adicionalmente la cepa CA-22 a un tratamiento de mutación con 200 mg/l de NTG. En un tubo de ensayo con un diámetro interior de 18 mm se colocaron 6 ml de un medio que comprendía la composición mostrada en la tabla 9 que entonces se sometió a esterilización por vapor a 121 °C durante 15 minutos para preparar un medio de tubo de ensayo. Se seleccionaron 80 colonias mutantes que tomaban color de amarillo a naranja, cada una de las cuales se inoculó entonces, en una cantidad de un bucle de platino, en el medio de tubo de ensayo y se sometió a cultivo con agitación alternante a 330 rpm y 28 °C durante 5 días. Entonces se sometieron estos cultivos a separación por centrifugación, seguido por análisis de compuestos carotenoides en los cuerpos celulares resultantes usando cromatografía de líquidos de alta resolución, con el resultado de proporcionar una cepa que tenía una proporción de producto del 50 % en masa o más de  $\beta$ -caroteno con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides. Los resultados del análisis de compuestos carotenoides en esta cepa se muestran en la tabla 12. Para fines de comparación, los resultados del análisis de compuestos carotenoides en la cepa CA-22 que se cultivó en las mismas condiciones que las descritas anteriormente se muestran en la tabla 13.

[Tabla 12]

| Compuesto carotenoide  | Concentración de producto por unidad de volumen de cultivo (mg/l) | Proporción de producto (% en masa) |
|------------------------|---|------------------------------------|
| $\beta$ -caroteno      | 17,4  | 96,1                               |
| equinenona             | 0,4   | 2,2                                |
| 3-hidroxi-equinenona   | -   |                                    |
| cantaxantina           | 0,3   | 1,7                                |
| adonirubina            | -   |                                    |
| $\beta$ -criptoxantina | -   |                                    |

|               |   |  |
|---------------|---|--|
| astaxantina   | - |  |
| asteroidenona | - |  |
| adonixantina  | - |  |
| zeaxantina    | - |  |

“-” muestra por debajo del límite de detección (0,1 mg/l).

[Tabla 13]

| Compuesto carotenoide | Concentración de producto por unidad de volumen de cultivo (mg/l) | Proporción de producto (% en masa) |
|-----------------------|---|------------------------------------|
| β-caroteno            | 1,2   | 5,7                                |
| equinenona            | 2,5   | 11,9                               |
| 3-hidroxi equinenona  | -   |                                    |
| cantaxantina          | 16,1  | 76,7                               |
| adonirubina           | 0,9   | 4,3                                |
| β-criptoxantina       | -   |                                    |
| astaxantina           | 0,3   | 1,4                                |
| asteroidenona         | -   |                                    |
| adonixantina          | -   |                                    |
| zeaxantina            | -   |                                    |

“-” muestra por debajo del límite de detección (0,1 mg/l).

#### Ejemplo 7

5 Se sometió una cepa, E-396 (FERM BP-4283), a un tratamiento de mutación con NTG, seguido por la selección de colonias amarillas para proporcionar una cepa mutante, ZE-7, que tenía una productividad mejorada de zeaxantina. Se sometió adicionalmente la cepa ZE-7 a un tratamiento de mutación con 150 mg/l de NTG. En un tubo de ensayo con un diámetro interior de 18 mm se colocaron 6 ml de un medio que comprendía la composición mostrada en la  
10 tabla 9 que entonces se sometió a esterilización por vapor a 121 °C durante 15 minutos para preparar un medio de tubo de ensayo. Se seleccionaron 60 colonias mutantes que tomaban color de amarillo a naranja, cada una de las cuales se inoculó entonces, en una cantidad de un bucle de platino, en el medio de tubo de ensayo y se sometió a cultivo con agitación alternante a 330 rpm y 28 °C durante 5 días. Entonces se sometieron estos cultivos a separación por centrifugación, seguido por análisis de compuestos carotenoides en los cuerpos celulares resultantes  
15 usando cromatografía de líquidos de alta resolución, con el resultado de proporcionar una cepa que tenía una proporción de producto del 50 % en masa o más de β-caroteno con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides. Los resultados del análisis de compuestos carotenoides en esta cepa se muestran en la tabla 14. Para fines de comparación, los resultados del análisis de compuestos carotenoides en la cepa ZE-7 que se cultivó en las mismas condiciones que las descritas anteriormente se muestran en la tabla 15.

[Tabla 14]

| Compuesto carotenoide | Concentración de producto por unidad de volumen de cultivo (mg/l) | Proporción de producto (% en masa) |
|-----------------------|---|------------------------------------|
| β-caroteno            | 16,0  | 100                                |
| equinenona            | -   |                                    |
| 3-hidroxi equinenona  | -   |                                    |
| cantaxantina          | -   |                                    |
| adonirubina           | -   |                                    |
| β-criptoxantina       | -   |                                    |
| astaxantina           | -   |                                    |
| asteroidenona         | -   |                                    |
| adonixantina          | -   |                                    |

|            |   |
|------------|---|
| zeaxantina | - |
|------------|---|

“-” muestra por debajo del límite de detección (0,1 mg/l).

[Tabla 15]

| Compuesto carotenoide | Concentración de producto por unidad de volumen de cultivo (mg/l) | Proporción de producto (% en masa) |
|-----------------------|---|------------------------------------|
| β-caroteno            | 4,0   | 23,5                               |
| equinenona            | -   |                                    |
| 3-hidroxi equinenona  | -   |                                    |
| cantaxantina          | -   |                                    |
| adonirubina           | -   |                                    |
| β-criptoxantina       | 2,4   | 14,1                               |
| astaxantina           | -   |                                    |
| asteroidenona         | -   |                                    |
| adonixantina          | -   |                                    |
| zeaxantina            | 10,6  | 62,4                               |

“-” muestra por debajo del límite de detección (0,1 mg/l).

## Ejemplo 8 (comparativo)

5 Se sometió una cepa, A-581-1 (FERM BP-4671) a un tratamiento de mutación con irradiación ultravioleta usando una lámpara de UV. En un tubo de ensayo con un diámetro interior de 18 mm se colocaron 6 ml de un medio que comprendía la composición mostrada en la tabla 9 que entonces se sometió a esterilización por vapor a 121 °C durante 15 minutos para preparar un medio de tubo de ensayo. Se seleccionaron 3.000 colonias mutantes que tomaban un color amarillo, cada una de las cuales se inoculó entonces, en una cantidad de un bucle de platino, en el medio de tubo de ensayo y se sometió a cultivo con agitación alternante a 330 rpm y 28 °C durante 4 días. Entonces se sometieron estos cultivos a separación por centrifugación, seguido por análisis de compuestos carotenoides en los cuerpos celulares resultantes usando cromatografía de líquidos de alta resolución, con el resultado de proporcionar una cepa que tenía una proporción de producto inferior al 20 % en masa de cada uno de equinenona, 15 β-criptoxantina, 3-hidroxi equinenona, asteroidenona, cantaxantina, zeaxantina, adonirubina, adonixantina y astaxantina con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides. Los resultados del análisis de compuestos carotenoides en esta cepa se muestran en la tabla 16. Para fines de comparación, los resultados del análisis de compuestos carotenoides en una disolución de cultivo en la que se cultivó la cepa A-581-1 en las mismas condiciones que las descritas anteriormente se muestran en la tabla 17.

[Tabla 16]

| Compuesto carotenoide | Concentración de producto por unidad de volumen de cultivo (mg/l) | Proporción de producto (% en masa) |
|-----------------------|---|------------------------------------|
| β-caroteno            | 2,9   | 64,4                               |
| equinenona            | 0,5   | 11,1                               |
| 3-hidroxi equinenona  | -   |                                    |
| cantaxantina          | 0,2   | 4,4                                |
| adonirubina           | 0,2   | 4,4                                |
| β-criptoxantina       | 0,3   | 6,7                                |
| astaxantina           | 0,2   | 4,4                                |
| asteroidenona         |   |                                    |
| adonixantina          | 0,2   | 4,4                                |
| zeaxantina            | -   |                                    |

“-” muestra por debajo del límite de detección (0,1 mg/l).

[Tabla 17]

| Compuesto carotenoide | Concentración de producto por unidad de volumen de cultivo (mg/l) | Proporción de producto (% en masa) |
|-----------------------|---|------------------------------------|
| β-caroteno            | 0,6   | 7,8                                |
| equinenona            | 0,6   | 7,8                                |
| 3-hidroxi equinenona  | -   |                                    |
| cantaxantina          | 0,7   | 9,1                                |
| adonirubina           | 0,4   | 5,2                                |
| β-criptoxantina       | -   |                                    |
| astaxantina           | 1,8   | 23,4                               |
| asteroidenona         | 0,4   | 5,2                                |
| adonixantina          | 2,7   | 35,1                               |
| zeaxantina            | 0,5   | 6,5                                |

“-” muestra por debajo del límite de detección (0,1 mg/l).

Ejemplo 9 (comparativo)

- 5 Se sometió una cepa, E-396 (FERM BP-4283), a un tratamiento de mutación con 100 mg/l de NTG (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina) permaneciendo a una temperatura de 28 °C durante 30 minutos. En un tubo de ensayo con un diámetro interior de 18 mm se colocaron 6 ml de un medio que comprendía la composición mostrada en la tabla 18 que entonces se sometió a esterilización por vapor a 121 °C durante 15 minutos para preparar un medio de tubo de ensayo. Se seleccionaron 60 colonias mutantes que tomaban un color de rosa a violeta rojizo, cada una de las cuales se inoculó entonces, en una cantidad de un bucle de platino, en el medio de tubo de ensayo y se sometió a
- 10 cultivo con agitación alternante a 330 rpm y 28 °C durante 4 días. Entonces se sometieron estos cultivos a separación por centrifugación, seguido por análisis de compuestos carotenoides en los cuerpos celulares resultantes usando cromatografía de líquidos de alta resolución, con el resultado de proporcionar una cepa que tenía una proporción de producto del 40 % en masa o más de licopeno con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides. Los resultados del análisis de compuestos carotenoides en esta cepa se muestran en la tabla 19. Para
- 15 fines de comparación, los resultados del análisis de compuestos carotenoides en una disolución de cultivo en la que se cultivó la cepa E-396 en las mismas condiciones que las descritas anteriormente se muestran en la tabla 20.

[Tabla 18]

| Composición   | Cantidad añadida (g/l)                          |
|---|---|
| extracto de levadura                                | 20  |
| peptona   | 5   |
| sacarosa  | 50  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 1,5   |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 3,8   |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 0,5   |
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 0,01  |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                | 0,01  |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                     | una cantidad a la que el medio se vuelve a pH 7 |

20 [Tabla 19]

| Compuesto carotenoide | Concentración de producto por unidad de volumen de cultivo (mg/l) | Proporción de producto (% en masa) |
|-----------------------|---|------------------------------------|
| licopeno              | 15,5  | 96,3                               |
| β-caroteno            | -   |                                    |
| equinenona            | -   |                                    |
| 3-hidroxi equinenona  | -   |                                    |

|                        |     |     |
|------------------------|-----|-----|
| cantaxantina           | -   |     |
| adonirubina            | -   |     |
| $\beta$ -criptoxantina | -   |     |
| astaxantina            | 0,3 | 1,9 |
| asteroidenona          | -   |     |
| adonixantina           | 0,3 | 1,9 |
| zeaxantina             | -   |     |

“-” muestra por debajo del límite de detección (0,1 mg/l).

[Tabla 20]

| Compuesto carotenoide  | Concentración de producto por unidad de volumen de cultivo (mg/l) | Proporción de producto (% en masa) |
|------------------------|---|------------------------------------|
| licopeno               | -   |                                    |
| $\beta$ -caroteno      | 1,6   | 6,6                                |
| equinenona             | 1,8   | 7,4                                |
| 3-hidroxi-equinenona   | 0,4   | 1,6                                |
| cantaxantina           | 1,6   | 6,6                                |
| adonirubina            | 1,0   | 4,1                                |
| $\beta$ -criptoxantina | -   |                                    |
| astaxantina            | 6,4   | 26,3                               |
| asteroidenona          | 1,5   | 6,2                                |
| adonixantina           | 8,6   | 35,4                               |
| zeaxantina             | 1,4   | 5,8                                |

“-” muestra por debajo del límite de detección (0,1 mg/l).

#### Ejemplo 10 (comparativo)

- 5 Se sometió una cepa, E-396 (FERM BP-4283), a un tratamiento de mutación con 100 mg/l de NTG (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina) permaneciendo a una temperatura de 28 °C durante 30 minutos. En un tubo de ensayo con un diámetro interior de 18 mm se colocaron 6 ml de un medio que comprendía la composición mostrada en la tabla 18 que entonces se sometió a esterilización por vapor a 121 °C durante 15 minutos para preparar un medio de tubo de ensayo.
- 10 Se seleccionaron aleatoriamente 800 colonias mutantes, cada una de las cuales se inoculó entonces, en una cantidad de un bucle de platino, en el medio de tubo de ensayo y se sometió a cultivo con agitación alternante a 330 rpm y 28 °C durante 4 días. Entonces se sometieron estos cultivos a separación por centrifugación, seguido por análisis de compuestos carotenoides en los cuerpos celulares resultantes usando cromatografía de líquidos de alta resolución, con el resultado de proporcionar una cepa que tenía una proporción de producto del 40 % en masa o más de licopeno con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides. Los resultados del análisis de compuestos carotenoides en esta cepa se muestran en la tabla 21. Para fines de comparación, los resultados del análisis de compuestos carotenoides en una disolución de cultivo en la que se cultivó la cepa E-396 en las mismas condiciones que las descritas anteriormente se muestran en la tabla 20.

20 [Tabla 21]

| Compuesto carotenoide | Concentración de producto por unidad de volumen de cultivo (mg/l) | Proporción de producto (% en masa) |
|-----------------------|---|------------------------------------|
| licopeno              | 10,1  | 74,3                               |
| $\beta$ -caroteno     | 0,2   | 1,5                                |
| equinenona            | 0,5   | 3,7                                |
| 3-hidroxi-equinenona  | -   |                                    |
| cantaxantina          | 0,3   | 2,2                                |
| adonirubina           | 0,4   | 2,9                                |

ES 2 387 674 T3

|                        |     |     |
|------------------------|-----|-----|
| $\beta$ -criptoxantina | -   |     |
| astaxantina            | 1,2 | 8,8 |
| asteroidenona          | -   |     |
| adonixantina           | 0,9 | 6,6 |
| zeaxantina             | -   |     |

"-" muestra por debajo del límite de detección (0,1 mg/l).

Ejemplo 11 (comparativo)

5 Se sometió una cepa, E-396 (FERM BP-4283), a un tratamiento de mutación con NTG, seguido por selección de colonias que tenían un tono de color oscuro de rojo para proporcionar una cepa mutante, Y-559, que tenía una productividad mejorada de astaxantina. Se sometió adicionalmente la cepa Y-559 a un tratamiento de mutación con 150 mg/l de NTG. En un tubo de ensayo con un diámetro interior de 18 mm se colocaron 6 ml de un medio que comprendía la composición mostrada en la tabla 18 que entonces se sometió a esterilización por vapor a 121 °C durante 15 minutos para preparar un medio de tubo de ensayo. Se seleccionaron 80 colonias mutantes que tomaban un color de rosa a violeta rojizo, cada una de las cuales se inoculó entonces, en una cantidad de un bucle de platino, en el medio de tubo de ensayo y se sometió a cultivo con agitación alternante a 330 rpm y 28 °C durante 5 días. Entonces se sometieron estos cultivos a separación por centrifugación, seguido por análisis de compuestos carotenoides en los cuerpos celulares resultantes usando cromatografía de líquidos de alta resolución, con el resultado de proporcionar una cepa que tenía una proporción de producto del 40 % en masa o más de licopeno con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides. Los resultados del análisis de compuestos carotenoides en esta cepa se muestran en la tabla 22. Para fines de comparación, los resultados del análisis de compuestos carotenoides en una disolución de cultivo en la que se cultivó la cepa Y-559 en las mismas condiciones que las descritas anteriormente se muestran en la tabla 23.

20 [Tabla 22]

| Compuesto carotenoide  | Concentración de producto por unidad de volumen de cultivo (mg/l) | Proporción de producto (% en masa) |
|------------------------|---|------------------------------------|
| licopeno               | 163,9   | 99,6                               |
| $\beta$ -caroteno      | -   |                                    |
| equinenona             | -   |                                    |
| 3-hidroxi equinenona   | -   |                                    |
| cantaxantina           | -   |                                    |
| adonirubina            | -   |                                    |
| $\beta$ -criptoxantina | -   |                                    |
| astaxantina            | 0,7   | 0,4                                |
| asteroidenona          | -   |                                    |
| adonixantina           | -   |                                    |
| zeaxantina             | -   |                                    |

"-" muestra por debajo del límite de detección (0,1 mg/l).

[Tabla 23]

| Compuesto carotenoide | Concentración de producto por unidad de volumen de cultivo (mg/l) | Proporción de producto (% en masa) |
|-----------------------|---|------------------------------------|
| licopeno              | -   |                                    |
| $\beta$ -caroteno     | 26,2  | 13,6                               |
| equinenona            | 7,9   | 4,1                                |
| 3-hidroxi equinenona  | 0,9   | 0,5                                |
| cantaxantina          | 12,0  | 6,3                                |
| adonirubina           | 20,3  | 10,6                               |

|                        |      |      |
|------------------------|------|------|
| $\beta$ -criptoxantina | -    |      |
| astaxantina            | 67,7 | 35,3 |
| asteroidenona          | -    |      |
| adonixantina           | 56,4 | 29,4 |
| zeaxantina             | 0,6  | 0,3  |

“-” muestra por debajo del límite de detección (0,1 mg/l).

Ejemplo 12 (comparativo)

5 Se sometió una cepa, E-396 (FERM BP-4283), a un tratamiento de mutación con NTG, seguido por la selección de colonias de color naranja para proporcionar una cepa mutante, CA-22, que tenía una productividad mejorada de cantaxantina. Se sometió adicionalmente la cepa CA-22 a un tratamiento de mutación con 200 mg/l de NTG. En un tubo de ensayo con un diámetro interior de 18 mm se colocaron 6 ml de un medio que comprendía la composición mostrada en la tabla 18 que entonces se sometió a esterilización por vapor a 121 °C durante 15 minutos para preparar un medio de tubo de ensayo. Se seleccionaron 60 colonias mutantes que tomaban un color de rosa a 10 violeta rojizo, cada una de las cuales se inoculó entonces, en una cantidad de un bucle de platino, en el medio de tubo de ensayo y se sometió a cultivo con agitación alternante a 330 rpm y 28 °C durante 5 días. Entonces se sometieron estos cultivos a separación por centrifugación, seguido por análisis de compuestos carotenoides en los cuerpos celulares resultantes usando cromatografía de líquidos de alta resolución, con el resultado de proporcionar una cepa que tenía una proporción de producto del 40 % en masa o más de licopeno con respecto a la cantidad de 15 producción completa de carotenoides. Los resultados del análisis de compuestos carotenoides en esta cepa se muestran en la tabla 24. Para fines de comparación, los resultados del análisis de compuestos carotenoides en la cepa CA-22 que se cultivó en las mismas condiciones que las descritas anteriormente se muestran en la tabla 25.

[Tabla 24]

| Compuesto carotenoide  | Concentración de producto por unidad de volumen de cultivo (mg/l) | Proporción de producto (% en masa) |
|------------------------|---|------------------------------------|
| licopeno               | 19,3  | 98,0                               |
| $\beta$ -caroteno      | -   |                                    |
| equinenona             | -   |                                    |
| 3-hidroxi equinenona   | -   |                                    |
| cantaxantina           | 0,4   | 2,0                                |
| adonirubina            | -   |                                    |
| $\beta$ -criptoxantina | -   |                                    |
| astaxantina            | -   |                                    |
| asteroidenona          | -   |                                    |
| adonixantina           | -   |                                    |
| zeaxantina             | -   |                                    |

“-” muestra por debajo del límite de detección (0,1 mg/l).

20

[Tabla 25]

| Compuesto carotenoide  | Concentración de producto por unidad de volumen de cultivo (mg/l) | Proporción de producto (% en masa) |
|------------------------|---|------------------------------------|
| licopeno               | -   |                                    |
| $\beta$ -caroteno      | 1,2   | 5,7                                |
| equinenona             | 2,5   | 11,9                               |
| 3-hidroxi equinenona   | -   |                                    |
| cantaxantina           | 16,1  | 76,7                               |
| adonirubina            | 0,9   | 4,3                                |
| $\beta$ -criptoxantina | -   |                                    |

|               |     |     |
|---------------|-----|-----|
| astaxantina   | 0,3 | 1,4 |
| asteroidenona | -   |     |
| adonixantina  | -   |     |
| zeaxantina    | -   |     |

"-" muestra por debajo del límite de detección (0,1 mg/l).

Ejemplo 13 (comparativo)

5 Se sometió una cepa, E-396 (FERM BP-4283), a un tratamiento de mutación con NTG, seguido por la selección de colonias amarillas para proporcionar una cepa mutante, ZE-7, que tenía una productividad mejorada de zeaxantina. Se sometió adicionalmente la cepa ZE-7 a un tratamiento de mutación con 150 mg/l de NTG. En un tubo de ensayo con un diámetro interior de 18 mm se colocaron 6 ml de un medio que comprendía la composición mostrada en la tabla 18 que entonces se sometió a esterilización por vapor a 121 °C durante 15 minutos para preparar un medio de tubo de ensayo. Se seleccionaron 80 colonias mutantes que tomaban un color de rosa a violeta rojizo, cada una de las cuales se inoculó entonces, en una cantidad de un bucle de platino, en el medio de tubo de ensayo y se sometió a cultivo con agitación alternante a 330 rpm y 28 °C durante 5 días. Entonces se sometieron estos cultivos a separación por centrifugación, seguido por análisis de compuestos carotenoides en los cuerpos celulares resultantes usando cromatografía de líquidos de alta resolución, con el resultado de proporcionar una cepa que tenía una proporción de producto del 40 % en masa o más de licopeno con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides. Los resultados del análisis de compuestos carotenoides en esta cepa se muestran en la tabla 26. Para fines de comparación, los resultados del análisis de compuestos carotenoides en una disolución de cultivo en la que se cultivó la cepa ZE-7 en las mismas condiciones que las descritas anteriormente se muestran en la tabla 27.

[Tabla 26]

| Compuesto carotenoide | Concentración de producto por unidad de volumen de cultivo (mg/l) | Proporción de producto (% en masa) |
|-----------------------|---|------------------------------------|
| licopeno              | 17,1  | 96,1                               |
| β-caroteno            | -   |                                    |
| equinenona            | -   |                                    |
| 3-hidroxi equinenona  | -   |                                    |
| cantaxantina          | -   |                                    |
| adonirubina           | -   |                                    |
| β-criptoxantina       | 0,2   | 1,1                                |
| astaxantina           | -   |                                    |
| asteroidenona         | -   |                                    |
| adonixantina          | -   |                                    |
| zeaxantina            | 0,5   | 2,8                                |

"-" muestra por debajo del límite de detección (0,1 mg/l).

20

[Tabla 27]

| Compuesto carotenoide | Concentración de producto por unidad de volumen de cultivo (mg/l) | Proporción de producto (% en masa) |
|-----------------------|---|------------------------------------|
| licopeno              | -   |                                    |
| β-caroteno            | 4,0   | 23,5                               |
| equinenona            | -   |                                    |
| 3-hidroxi equinenona  | -   |                                    |
| cantaxantina          | -   |                                    |
| adonirubina           | -   |                                    |
| β-criptoxantina       | 2,4   | 14,1                               |
| astaxantina           | -   |                                    |

|               |      |      |
|---------------|------|------|
| asteroidenona | -    |      |
| adonixantina  | -    |      |
| zeaxantina    | 10,6 | 62,4 |

"-" muestra por debajo del límite de detección (0,1 mg/l).

Ejemplo 14 (comparativo)

5 Se sometió una cepa, A-581-1 (FERM BP-4671), a un tratamiento de mutación con irradiación ultravioleta usando una lámpara de UV. En un tubo de ensayo con un diámetro interior de 18 mm se colocaron 6 ml de un medio que comprendía la composición mostrada en la tabla 18 que entonces se sometió a esterilización por vapor a 121 °C durante 15 minutos para preparar un medio de tubo de ensayo. Se seleccionaron 100 colonias mutantes que tomaban un color rosa, cada una de las cuales se inoculó entonces, en una cantidad de un bucle de platino, en el medio de tubo de ensayo y se sometió a cultivo con agitación alternante a 330 rpm y 28 °C durante 4 días. Entonces se sometieron estos cultivos a separación por centrifugación, seguido por análisis de compuestos carotenoides en los cuerpos celulares resultantes usando cromatografía de líquidos de alta resolución, con el resultado de proporcionar una cepa que tenía una proporción de producto inferior al 20 % en masa de cada uno de  $\beta$ -caroteno, equinenona,  $\beta$ -criptoxantina, 3-hidroxi equinenona, asteroidenona, cantaxantina, zeaxantina, adonirubina, adonixantina y astaxantina con respecto a la cantidad de producción completa de carotenoides. Los resultados del análisis de compuestos carotenoides en esta cepa se muestran en la tabla 28. Para fines de comparación, los resultados del análisis de compuestos carotenoides en una disolución de cultivo en la que se cultivó la cepa A-581-1 en las mismas condiciones que las descritas anteriormente se muestran en la tabla 29.

[Tabla 28]

| Compuesto carotenoide  | Concentración de producto por unidad de volumen de cultivo (mg/l) | Proporción de producto (% en masa) |
|------------------------|---|------------------------------------|
| licopeno               | 3,3   | 54,1                               |
| $\beta$ -caroteno      | -   |                                    |
| equinenona             | 0,4   | 6,6                                |
| 3-hidroxi equinenona   | -   |                                    |
| cantaxantina           | 0,3   | 4,9                                |
| adonirubina            | 0,3   | 4,9                                |
| $\beta$ -criptoxantina | -   |                                    |
| astaxantina            | 1,1   | 18,0                               |
| asteroidenona          | -   |                                    |
| adonixantina           | 0,7   | 11,5                               |
| zeaxantina             | -   |                                    |

"-" muestra por debajo del límite de detección (0,1 mg/l).

20

[Tabla 29]

| Compuesto carotenoide  | Concentración de producto por unidad de volumen de cultivo (mg/l) | Proporción de producto (% en masa) |
|------------------------|---|------------------------------------|
| licopeno               | -   |                                    |
| $\beta$ -caroteno      | 0,6   | 7,8                                |
| equinenona             | 0,6   | 7,8                                |
| 3-hidroxi equinenona   | -   |                                    |
| cantaxantina           | 0,7   | 9,1                                |
| adonirubina            | 0,4   | 5,2                                |
| $\beta$ -criptoxantina | -   |                                    |
| astaxantina            | 1,8   | 23,4                               |
| asteroidenona          | 0,4   | 5,2                                |

|              |     |      |
|--------------|-----|------|
| adonixantina | 2,7 | 35,1 |
| zeaxantina   | 0,5 | 6,5  |

“-” muestra por debajo del límite de detección (0,1 mg/l).

**Aplicabilidad industrial**

5 El proceso descrito en el presente documento es útil para producir zeaxantina, β-caroteno y licopeno y una mezcla de carotenoides que contiene los mismos como componente principal que son útiles como agentes colorantes, agentes antioxidantes o similares.

10 En el presente documento se describe un proceso económico para producir zeaxantina, β-caroteno o licopeno con alta seguridad mediante el cual pueden suministrarse de manera estable.

15 Algunas cepas mutantes que producen zeaxantina, β-caroteno o licopeno también pueden producir simultáneamente otros compuestos carotenoides tales como, por ejemplo, β-criptoxantina y/o β-caroteno como subproductos, junto con zeaxantina, β-caroteno o licopeno como producto principal, siendo el proceso descrito en el presente documento también útil como proceso para producir eficazmente estas mezclas de carotenoides.

**Lista de secuencias**

- <110> Nippon Oil Corporation
- <120> Método para producir compuestos carotenoides
- 20 <130> Documento PH-2223PCT-US
- <150> Documento JP2003/325104
- <151> 17-9-2003
- <150> Documento JP2003/325130
- <151> 17-9-2003
- 25 <150> Documento JP2003/325144
- <151> 17-9-2003
- <160> 2
- <210> 1
- 30 <211> 1452
- <212> ADN
- <213> Desconocido
- <220>
- <223> Descripción de organismo desconocido: E-396
- 35 <400> 1

agtttgatcc tggctcagaa cgaacgctgg cggcaggctt aacacatgca agtcgagcga 60

ES 2 387 674 T3

gaccttcggg tctagcggcg gacgggtgag taacgcgtgg gaacgtgccc ttctctacgg 120  
 aatagccccg ggaaactggg agtaataccg tatacgcctt ttgggggaaa gatttatcgg 180  
 agaaggatcg gcccgcggtg gattaggtag ttgggtgggt aatggcccac caagccgacg 240  
 atccatagct ggtttgagag gatgatcagc cacactggga ctgagacacg gccagactc 300  
 ctacgggagg cagcagtggg gaatcttaga caatgggggc aaccctgatc tagccatgcc 360  
 gcgtgagtga tgaaggcctt agggttgtaa agctctttca gctgggaaga taatgacggt 420  
 accagcagaa gaagccccg ctaactccgt gccagcagcc gcgtaatac ggagggggct 480  
 agcgttggtc ggaattactg ggcgtaaagc gcacgtaggc ggactggaaa gtcagaggtg 540  
 aaatcccagg gctcaacctt ggaactgcct ttgaaactat cagtctggag ttcgagagag 600  
 gtgagtggaa ttccgagtgt agaggtgaaa ttcgtagata ttcggaggaa caccagtggc 660  
 gaaggcggct cactggctcg atactgacgc tgaggtgcga aagcgtgggg agcaaacagg 720  
 attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgaatgc cagacgtcgg caagcatgct 780  
 tgtcgggtgc acacctaacg gattaagcat tccgcctggg gagtacggtc gcaagattaa 840  
 aactcaaagg aattgacggg ggccccgaca agcgggtggag catgtggttt aattcgaagc 900  
 aacgcgcaga acctaccaaa cccttgacat ggcaggaccg ctggagagat tcagctttct 960  
 cgtaagagac ctgcacacag gtgctgcatg gctgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttc 1020  
 ggtaagtcc ggcaacgagc gcaaccacg tccctagttg ccagcaattc agttgggaac 1080  
 tctatggaaa ctgccgatga taagtcggag gaaggtgtgg atgacgtcaa gtcctcatgg 1140  
 gccttacggg ttgggctaca cacgtgctac aatgggtggg acagtgggtt aatccccaaa 1200  
 agccatctca gttcggattg tctctgcaa ctcgagggca tgaagttgga atcgctagta 1260  
 atcggggaac agcatgccgc ggtgaatacg ttccggggcc ttgtacacac cgcccgtcac 1320  
 accatgggag ttggttctac ccgacgacgn tgcgctaacc ttcggggggc aggcggccac 1380  
 ggtaggatca gcgactgggg tgaagtcgta acaaggtagc cgtaggggaa cctgcggctg 1440  
 gatcacctcc tt 1452

- <210> 2
- <211> 1426
- 5 <212> ADN
- <213> Desconocido
- <220>
- <223> Descripción de organismo desconocido: A-581-1
- <400> 2

ES 2 387 674 T3

tagagtttga tcctggctca gaacgaacgc tggcggcagg cttaacacat gcaagtcgag 60  
cgagaccttc gggctctagcg gcggacgggt gagtaacgcg tgggaacgtg cccttctcta 120  
cggaatagcc ccgggaaact gggagtaata ccgtatacgc cctttggggg aaagatttat 180  
cggagaagga tcggcccgcg ttggattagg tagttggtga ggtaacggct caccaagccg 240  
acgatccata gctggtttga gaggatgac agccacactg ggactgagac acggcccaga 300  
ctcctacggg aggcagcagt ggggaatctt agacaatggg ggcaaccctg atctagccat 360  
gccgcgtgag tgatgaaggc cttagggttg taaagctctt tcagctggga agataatgac 420  
ggtaccagca gaagaagccc cggctaactc cgtgccagca gccgcggtaa tacggagggg 480  
gctagcgttg ttcggaatta ctgggcgtaa agcgcacgta ggccggactgg aaagtcagag 540  
gtgaaatccc agggctcaac cttggaactg cctttgaaac tatcagtctg gagttcgaga 600  
gaggtgagtg gaattccgag tgtagagggtg aaattcgtag atattcggag gaacaccagt 660  
ggcgaaggcg gctcactggc tcgatactga cgctgaggtg cgaaagcgtg gggagcaaac 720  
aggattagat accctggtag tccacgccgt aaacgatgaa tgccagacgt cggcaagcat 780  
gcttgtcggg gtcacaccta acggattaag cattccgcct ggggagtacg gtcgcaagat 840  
taaaactcaa aggaattgac gggggcccgc acaagcgggt gagcatgtgg ttttaattcga 900  
agcaacgcgc agaaccttac caacccttga catggcagga ccgctggaga gattcagctt 960  
tctcgtaaga gacctgcaca caggtgctgc atggctgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg 1020  
ttcggttaag tccggcaacg agcgcgaacc acgtccctag ttgccagcat tcagttgggc 1080  
actctatgga aactgccggt gataagccgg aggaaggtgt ggatgacgtc aagtcctcat 1140  
ggcccttacg ggttgggcta cacacgtgct acaatggtgg tgacagtggg ttaatcccca 1200  
aaagccatct cagttcggat tgtcctctgc aactcgaggg catgaagttg gaatcgctag 1260  
taatcgcgga acagcatgcc gcggtgaata cgttcccggg ccttgtacac accgcccgtc 1320  
acaccatggg agttggttct acccgacgac gctgcgctaa cccttcgggg aggcaggcgg 1380  
ccacggtagg atcagcgact ggggtgaagt cgtaacaagg tagcca 1426

**REIVINDICACIONES**

1. Proceso para producir una mezcla de carotenoides que contiene zeaxantina y  $\beta$ -criptoxantina, que comprende inducir una mutación en una bacteria que produce astaxantina original en la que la secuencia de ADN que corresponde al ARN ribosómico 16S es no menos del 98 % homóloga a la secuencia descrita en SEQ ID NO: 1; cultivar para formar colonias en un medio sólido; seleccionar colonias amarillas a naranjas en dicho medio sólido; cultivar las colonias mutantes seleccionadas en cultivo; extraer y analizar los carotenoides en el cultivo; seleccionar una cepa mutante que tiene un 20 % o más de proporción en masa de zeaxantina con respecto a los carotenoides totales en dicho cultivo para proporcionar una bacteria que produce zeaxantina y  $\beta$ -criptoxantina; cultivar dicha bacteria; y recoger dicha mezcla de carotenoides que contiene zeaxantina y  $\beta$ -criptoxantina del cultivo resultante.
2. Proceso según la reivindicación 1, en el que dicha bacteria que produce astaxantina se selecciona de una cepa E-396 (FERM-BP-4283) y cepas mutantes de la misma, y una cepa A-581-1 (FERM BP-4671) y cepas mutantes de la misma.

Fig. 1

