

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 302**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03746432 .8**
96 Fecha de presentación: **07.04.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1496115**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.01.2005**

54 Título: **Procedimiento para obtener microorganismos que producen cantaxantina y para producir cantaxantina**

30 Prioridad:
15.04.2002 JP 2002112240

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.10.2012

73 Titular/es:
**JX NIPPON OIL & ENERGY CORPORATION
(100.0%)
6-3, Otemachi 2-chome Chiyoda-ku
Tokyo 100-8162, JP**

72 Inventor/es:
**HIRASAWA, KAZUAKI;
TSUBOKURA, AKIRA y
MIZUTA, HARUYOSHI**

74 Agente/Representante:
PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 389 302 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para obtener microorganismos que producen cantaxantina y para producir cantaxantina.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un procedimiento para obtener microorganismos que producen cantaxantina, y a un procedimiento para la producción microbiológica de cantaxantina. La cantaxantina es útil como pigmento rojo natural para aditivos de piensos, aditivos alimentarios, etc.

10

Antecedentes de la técnica

Como procedimiento para mejorar el tono de color de la yema de huevo, la carne y la piel de las aves de corral tales como los pollos, se usa ampliamente en el mundo la adición de cantaxantina a los piensos para animales. La cantaxantina también se usa en la industria de los piensos para animales para mejorar el tono de color de la carne o la piel de pescados tales como salmón, trucha, besugo o gamba, y también se usa en la industria alimentaria como agente colorante para alimentos y bebidas.

15

Se sabe que contienen cantaxantina determinadas especies de hongos (*Botanical Gazette*, 112, 228 – 232, 1950), peces y crustáceos. Los ejemplos de microorganismos que producen cantaxantina conocidos son los que pertenecen al género *Brevibacterium* (*Applied and Environmental Microbiology*, 55 (10), 2505, 1989), los que pertenecen al género *Rhodococcus* (publicación de patente JP (solicitud no examinada) N° 2-138996), los que pertenecen al género *Corynebacterium* (publicación de patente JP (solicitud no examinada) N° 6-343482), y la cepa bacteriana E-396 que pertenece a un nuevo género (publicación de patente JP (solicitud no examinada) N° 2001-95500). Como métodos de síntesis química, se conocen la oxidación de β -caroteno (*J. Amer. Chem. Soc.*, 78, 1427, 1956) y la síntesis a partir de la sal de fosfonio de 3-oxo-C15 (*Pure Appl. Chem.*, 51, 875, 1979).

20

25

Los documentos WO 0196591 y EP 1229126 describen un procedimiento para la producción microbiana de compuestos carotenoides en el que la relación de compuestos carotenoides formados se varía controlando la concentración de oxígeno disuelto en un medio de cultivo líquido durante el cultivo.

30

El documento EP 1138208 describe una sustancia que contiene pigmento para aditivos para piensos, que consiste en un precipitado de cultivo de microorganismos que contiene una concentración alta de compuestos carotenoides.

35

Miguel y col. (2001, *J. Agric. Food Chem.* vol. 49, páginas 1200 – 1202) describen una colección de 43 cepas mutantes de *Gordonia jacobaea* obtenida mediante tratamiento con metanosulfonato de etilo. Se extrajo cantaxantina y otros carotenoides de estos mutantes.

40

Nelis y col. (1989, *Applied and Environmental microbiology* vol. 55 (10), páginas 2505 – 2510) describen la reevaluación de la cepa de *Brevibacterium sp* KY-4313 por su potencial para producir cantaxantina.

El documento WO9906586 describe un tipo de cepa DSM 11574 de la especie *Paracoccus* que produce y secreta carotenoides y un procedimiento para producir carotenoides.

45 **Descripción de la invención**

Sin embargo, en el procedimiento mencionado antes para la síntesis química de la cantaxantina, se usa un disolvente orgánico. Por lo tanto, este procedimiento es problemático en términos de seguridad y de las preferencias por los productos naturales hoy en día. El cultivo convencional usando microorganismos también tiene problemas en cuanto que la productividad es baja y la extracción de productos naturales es muy costosa.

50

En relación con la cepa E-396 que se conoce como un microorganismo que produce compuestos carotenoides, su seguridad ya se ha garantizado y ya se ha descrito un procedimiento para producir compuestos carotenoides muy concentrados que comprenden astaxantina. Sin embargo, la relación producida de cantaxantina a carotenoides totales es baja.

55

Como alternativa a la cantaxantina, se puede usar la capsantina que se extrae de la planta del pimentón, para mejorar el tono de color de la yema de huevo de gallinas. Puesto que la capsantina es muy inestable en términos de calor, luz o similares, y en el crecimiento de la planta del pimentón influye significativamente el tiempo atmosférico, es difícil proporcionar capsantina en niveles industrialmente estables.

60

Por consiguiente, se desea un procedimiento para producir cantaxantina, que sea muy seguro y siempre estable y de bajo precio.

65

Como resultado de estudios intensos y exhaustivos dirigidos a solucionar los problemas mencionados antes, los autores de la presente invención han encontrado que se podían obtener fácilmente microorganismos en los que la

relación de cantaxantina es relativamente alta con respecto a la cantidad total de carotenoides producidos, mediante mutación de los microorganismos que producen astaxantina. Esto llevó a la realización de la presente invención.

Específicamente, la presente invención proporciona los siguientes medios.

- 5 1. Un procedimiento para obtener microorganismos que producen cantaxantina, que comprende las etapas de:
 - 10 (i) inducir mutación en microorganismos que producen astaxantina que tienen una relación de aproximadamente 2 a 20 % en masa de cantaxantina producida respecto a la cantidad total de carotenoides producidos, en los que la secuencia de nucleótidos del ADN correspondiente a su ARN ribosómico 16S tiene una homología de 98 % o mayor con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, y
 - 15 (ii) seleccionar un mutante que tenga una relación de al menos 60 % en masa de cantaxantina producida con respecto a la cantidad total de carotenoides producidos.
- 20 2. El procedimiento de acuerdo con el párrafo 1 anterior, en el que cada una de las relaciones de β -criptoxantina, zeaxantina, 3-hidroxiéquinenona, asteroidenona, adonirubina, adonixantina y astaxantina producidas a partir de microorganismos que producen cantaxantina, es menor del 20 % en masa respecto a la cantidad total de carotenoides producidos.
- 25 3. El procedimiento de acuerdo con los párrafos 1 o 2 anteriores, en el que los microorganismos que producen cantaxantina se seleccionan de la cepa E-396 (FERM BP-4283) y un mutante de la misma, y la cepa A-581-1 (FERM BP-4671) y un mutante de la misma.
4. n procedimiento para la producción microbiológica de cantaxantina que comprende cultivar microorganismos que producen cantaxantina obtenidos por un procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 3 anteriores, y recuperar la cantaxantina producida.

También se describe en el presente documento:

- 30 (1) Un procedimiento para producir cantaxantina que comprende las etapas de: inducir mutación en microorganismos que producen astaxantina, en los que la secuencia de nucleótidos del ADN correspondiente a su ARN ribosómico 16S es sustancialmente homóloga a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, obtener microorganismos que producen cantaxantina seleccionando un mutante que tiene una relación mayor de cantaxantina producida (% en masa) respecto a la cantidad total de carotenoides producidos que la de una cepa original; y recuperar la cantaxantina o una mezcla de carotenoides que comprende cantaxantina del producto de cultivo de los microorganismos que producen cantaxantina.
- 35 (2) El procedimiento de acuerdo con el apartado (1) anterior, en el que la relación de cantaxantina producida por los microorganismos que producen cantaxantina es al menos 40 % en masa respecto a la cantidad total de carotenoides producidos.
- 40 (3) El procedimiento de acuerdo con el apartado (1) anterior, en el que cada una de las relaciones de β -criptoxantina, zeaxantina, 3-hidroxiéquinenona, asteroidenona, adonirubina, adonixantina y astaxantina producidas a partir de microorganismos que producen cantaxantina, es menor de 20 % en masa respecto a la cantidad total de carotenoides producidos.
- 45 (4) El procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de los apartados (1) a (3) anteriores, en el que los microorganismos que producen astaxantina se seleccionan de la cepa E-396 (que se ha depositado en el Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana (el Depositario de organismos de patentes internacional del Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada; AIST Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón) el 27 de abril de 1993, con el número de acceso FERM BP-4283) y un mutante de la misma, y la cepa A-581-1 (que se ha depositado en el Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana (el Depositario de organismos de patentes internacional del Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada; AIST Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón) el 20 de mayo de 1994, con el número de acceso FERM BP-4671) y un mutante de la misma.

La presente invención se describe en lo sucesivo con más detalle.

- 60 En el procedimiento de acuerdo con la presente invención, se usa un microorganismo que produce astaxantina como cepa original para la mutación. Un ejemplo de dicho microorganismo es un microorganismo que produce astaxantina en el que la secuencia de nucleótidos del ADN correspondiente a su ARN ribosómico 16S es sustancialmente homóloga a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. La expresión "sustancialmente homóloga" usada en el presente documento se refiere a una homología de 98 % o mayor en vista, por ejemplo, de la frecuencia de errores en la secuenciación de nucleótidos del ADN.
- 65

Los ejemplos específicos de microorganismos que producen astaxantina que tienen una secuencia sustancialmente homóloga a la secuencia anterior incluyen la cepa E-396 (FERM BP-4283), la cepa A-581-1 (FERM BP-4671), diferentes mutantes obtenidos por mutación y mejora de la cepa E-396 o A-581-1 y especies relacionadas de las mismas. La secuencia de nucleótidos del ADN mostrada en la SEQ ID NO: 1 corresponde al ARN ribosómico de la cepa E-396, y la secuencia de nucleótidos de ADN mostrada en la SEQ ID NO: 2 corresponde al ARN ribosómico de la cepa A-581-1. La homología de la secuencia de nucleótidos del ARN ribosómico 16S entre la cepa E-396 y la cepa A-581-1 es 99,4 %, y esto indica que son cepas que están estrechamente relacionadas. Por consiguiente, estas cepas forman un grupo de bacterias que producen carotenoides. En el procedimiento de acuerdo con la presente invención, una cepa original usada en la mutación, se define como un microorganismo que produce astaxantina en el que la secuencia de nucleótidos del ADN correspondiente a su ARN ribosómico 16S tiene una homología de 98 % o mayor con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, es decir la cepa E-396, la cepa A-581-1, mutantes de la cepa E-396 o de la cepa A-581-1, y especies relacionadas de las mismas.

Se describe la cepa E-396, que se ilustra como el microorganismo que produce astaxantina usado en la presente invención. Esta cepa ha sido aislada recientemente por los autores de la presente invención y se ha depositado en el Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana (el Depositario de organismos de patentes internacional del Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada) el 27 de abril de 1993, con el número de acceso FERM BP-4283). Un ejemplo más específico de otro microorganismo es la cepa A-581-1. Esta cepa ha sido aislada recientemente por los autores de la presente invención y se ha depositado en el Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana (el Depositario de organismos de patentes internacional del Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada) el 20 de mayo de 1994, con el número de acceso FERM BP-4283).

En la presente invención, el procedimiento para la mutación de los microorganismos que producen astaxantina no está particularmente limitado, siempre que el procedimiento pueda inducir mutación. Los ejemplos de procedimientos que se pueden usar incluyen: procedimientos químicos que usan agentes mutantes tales como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NGT) o metanosulfonato de etilo (EMS); procedimientos físicos tales como irradiación ultravioleta o irradiación con rayos X; y procedimientos biológicos usando recombinación de genes o transposones. Esta mutación se puede llevar a cabo una vez. Alternativamente, la mutación se puede llevar a cabo dos o más veces, por ejemplo, preparando un mutante del microorganismo que produce astaxantina por esta mutación, y después mutando el mutante resultante.

En la presente invención, un mutante en el que la relación de cantaxantina producida es particularmente alta respecto a la cantidad total de carotenoides, se puede seleccionar entre los mutantes obtenidos por mutación de los microorganismos que producen astaxantina, analizando el compuesto carotenoide en la disolución de cultivo del mutante.

Por ejemplo, este procedimiento de cultivo se lleva a cabo de la siguiente manera. Específicamente, el cultivo se lleva a cabo en un medio que contiene un componente que es necesario para el crecimiento de los microorganismos que producen astaxantina y que genera un compuesto carotenoide. El procedimiento del cultivo puede ser cultivo en agitación usando un tubo flexible, matraz o similar, o mediante cultivo con agitación-aireación. Un compuesto carotenoide se puede analizar por cualquier procedimiento, siempre que de este modo el compuesto carotenoide se pueda separar y detectar. Por ejemplo, se pueden usar la cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía en capa fina o cromatografía en papel.

En la presente invención, los microorganismos que producen cantaxantina se obtienen seleccionando un mutante en el que la relación de cantaxantina es al menos 60 % en masa respecto a la cantidad total de carotenoides. La expresión "cantidad total de carotenoides" como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad total de compuestos carotenoides tales como astaxantina, cantaxantina, adonixantina, β -caroteno, equineona, zeaxantina, β -criptoxantina, 3-hidroxiéquinenona, asteroidenona o adonirubina.

Los microorganismos que producen astaxantina tales como la cepa E-396, producen simultáneamente diferentes compuestos carotenoides tales como astaxantina, cantaxantina, adonixantina, β -caroteno, equineona, zeaxantina, β -criptoxantina, 3-hidroxiéquinenona, asteroidenona o adonirubina. Por lo tanto, la relación de cantaxantina con respecto a la cantidad total de carotenoides es baja, y en general es aproximadamente de 2 % a 20 %.

Un mutante que se selecciona induce mutación en los microorganismos que producen astaxantina, y la relación de cantaxantina producida es particularmente alta respecto a la cantidad total de carotenoides. La condición mínima para la relación de cantaxantina que se usa como referencia para la selección, es que esta relación es mayor que la de la cepa original antes de la mutación para producir cantaxantina. También se describe en el presente documento, un mutante seleccionado que produce carotenoides que contienen preferiblemente al menos 40 % en masa de cantaxantina, y más preferiblemente al menos 60 % en masa, basado en la cantidad total de carotenoides producidos.

La biosíntesis de la astaxantina se deduce como sigue. Los anillos de 6 miembros en ambos extremos del β -caroteno son modificados por cetolasa e hidroxilasa. Si la eliminación de esta hidroxilasa es completa, se deduce

que solo se producen β -caroteno, equinenona y cantaxantina, y que la β -criptoxantina, zeaxantina, 3-hidroxi equinenona, asteroidenona, adonirubina, adonixantina y astaxantina, que necesitan la hidroxilasa, no se producen. Si la eliminación de esta hidroxilasa es incompleta, se deduce que las relaciones de β -criptoxantina, zeaxantina, 3-hidroxi equinenona, asteroidenona, adonirubina, adonixantina y astaxantina con respecto a la cantidad total de carotenoides se reducen. Por consiguiente, como otro medio eficaz para seleccionar microorganismos que producen cantaxantina de entre los mutantes, la selección se puede hacer basándose en el fenómeno de que las relaciones de β -criptoxantina, zeaxantina, 3-hidroxi equinenona, asteroidenona, adonirubina, adonixantina y astaxantina, respecto a la cantidad total de carotenoides son bajas. La selección se puede hacer basándose en el fenómeno de que la relación de cada compuesto respecto a los carotenoides totales preferiblemente es inferior a 20 % en masa, y más preferiblemente inferior a 10 % en masa.

En la presente invención, el procedimiento para cultivar microorganismos que producen cantaxantina para recuperar la cantaxantina o una mezcla de carotenoides que comprende cantaxantina, puede ser cualquier procedimiento siempre que se produzca cantaxantina. Los ejemplos de los procedimientos que se pueden usar son los siguientes. Específicamente, un medio comprende fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas y si es necesario, requisitos nutricionales particulares (p. ej., vitaminas, aminoácidos o ácidos nucleicos) que son necesarios en el crecimiento de los microorganismos que producen cantaxantina. Los ejemplos de fuentes 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; y alcoholes tales como etanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol e isobutanol. La cantidad de fuentes de carbono añadidas varía dependiendo de sus tipos, y en general es de 1 a 100 g, preferiblemente de 2 a 50 g por litro de medio. Los ejemplos de fuentes de nitrógeno incluyen nitrato potásico, nitrato amónico, cloruro amónico, sulfato amónico, fosfato amónico, amoníaco y urea. Estos se pueden usar solos o en una combinación de dos o más. La cantidad de fuentes de nitrógeno añadidas varía dependiendo de sus tipos, y en general es de 0,1 a 20 g, preferiblemente de 1 a 10 g por litro de medio. Los ejemplos de sales inorgánicas incluyen fosfato potásico monobásico, fosfato potásico dibásico, hidrogenofosfato disódico, sulfato magnésico, cloruro magnésico, sulfato de hierro, cloruro de hierro, sulfato de manganeso, cloruro de manganeso, sulfato de cinc, cloruro de cinc, sulfato de cobre, cloruro de calcio, carbonato de calcio y carbonato de sodio. Estos se pueden usar solos o en una combinación de dos o más. La cantidad de sales inorgánicas añadidas varía dependiendo de sus tipos, y en general es de 0,1 mg a 10 g por litro de medio. Los ejemplos de requisitos nutricionales particulares incluyen vitaminas, ácidos nucleicos, extracto de levadura, peptona, extracto de carne, extracto de malta, licor de maceración de maíz, levadura seca, torta de soja, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de linaza. Estos se pueden usar solos o en combinación de dos o más. Las cantidades de los requisitos nutricionales particulares añadidos varían dependiendo de sus tipos, y en general es de 0,01 mg a 100 g por litro de medio. El pH del medio se ajusta entre 2 y 12, preferiblemente entre 6 y 9. El cultivo en agitación o el cultivo en agitación-aireación se lleva a cabo de 10 °C a 70 °C, preferiblemente de 20 °C a 35 °C, en general durante 1 a 20 días, y preferiblemente durante 2 a 9 días.

Posteriormente, se elimina la humedad de la disolución de cultivo así obtenida. La cantidad de humedad que debería eliminarse de la disolución de cultivo con el fin de obtener una sustancia que contiene cantaxantina, varía dependiendo de las condiciones tales como un contenido de pigmento de la disolución de cultivo. En general, se lleva a cabo primero la filtración y se deshidrata el precipitado si hay que eliminar más la humedad. La filtración se puede llevar a cabo mediante procedimientos usados habitualmente tales como filtración o centrifugación. Cuando el contenido del compuesto carotenoide en el precipitado debe aumentarse, la humedad se puede eliminar por deshidratación del precipitado. Los ejemplos de procedimientos de deshidratación incluyen el secado por atomización, secado en tambor y liofilización generales.

El precipitado de cultivo así obtenido de los microorganismos que producen cantaxantina se puede usar en este estado como sustancia que contiene un pigmento para aditivos de piensos. Cuando la cantaxantina y el compuesto carotenoide obtenidos por el procedimiento de la presente invención se usan como un agente colorante para piensos, etc., se pueden añadir antioxidantes tales como butilhidroxitolueno, etoxiquina, o vitamina E para prevenir que se degraden la cantaxantina y los compuestos carotenoides. Además, las superficies de los mismos se pueden cubrir con gelatina, etc.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

La presente invención se describe en lo sucesivo con más detalle con referencia a los ejemplos, pero no se limita a los mismos.

Ejemplo 1

La cepa E-396 (FERM BP-4283, relación de cantaxantina producida: 7,4 % en masa) se dejó reposar a 28 °C durante 30 minutos y se sometió a mutación con NTG 150 mg/l (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina). Se puso un medio (6 ml) que tenía una composición mostrada en la tabla 1 en un tubo de ensayo (diámetro interior: 18 mm) y se esterilizó con vapor a 121 °C durante 15 min para preparar un medio en el tubo de ensayo. Se inoculó cada uno de los 400 mutantes que se sometieron a aislamiento de colonia en un medio en tubo de ensayo mediante un bucle de inoculación, y se llevó a cabo cultivo en agitación recíproca (300 rpm) a 28 °C durante 4 días. Posteriormente, este

producto del cultivo se centrifugó, y se analizó en las células resultantes los compuestos carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución. Como resultado, se obtuvo una cepa que presentaba una relación de cantaxantina respecto a la cantidad total de carotenoides producidos de 60 % en masa o mayor. Los resultados del análisis de los compuestos carotenoides en esta cepa se muestran en la tabla 2.

5

Tabla 1

Composición	Cantidad añadida, g/l
Extracto de levadura	20
Peptona	5
Sacarosa	50
KH ₂ PO ₄	1,5
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	3,8
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,01
Na ₂ CO ₃	La cantidad con la que el medio alcanza el pH 7

Tabla 2

10

Compuesto carotenoide	Concentración de producto por disolución de cultivo, mg/l	Relación de producto % en masa
β-Caroteno	0,3	7,1
Equinenona	0,5	11,9
3-Hidroxi equinenona	0,0	0,0
Cantaxantina	2,7	64,3
Adonirubina	0,6	14,3
β-Criptoxantina	0,0	0,0
Astaxantina	0,1	2,4
Asteroidenona	0,0	0,0
Adonixantina	0,0	0,0
Zeaxantina	0,0	0,0

Ejemplo 2

15

La cepa E-396 (FERM BP-4283) se mutó con NTG, se seleccionaron colonias con un color rojo oscuro, y se obtuvo una variante Y-1071 (relación de cantaxantina producida: 6,5 % en masa) con productividad potenciada de astaxantina. Esta cepa Y-1071 se mutó otra vez con NTG. Se puso un medio (6 ml) que tenía la composición mostrada en la tabla 1 en un tubo de ensayo (diámetro interior: 18 mm) y se esterilizó con vapor a 121 °C durante 15 min para preparar un medio en el tubo de ensayo. Se inoculó cada uno de los 1000 mutantes que se sometieron a aislamiento de colonia en un medio en tubo de ensayo mediante un bucle de inoculación, y se llevó a cabo cultivo en agitación recíproca (300 rpm) a 28 °C durante 4 días. Posteriormente, este producto del cultivo se centrifugó, y se analizó en las células resultantes los compuestos carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución. Como resultado, se obtuvieron dos cepas en las que cada una de las relaciones de β-criptoxantina, zeaxantina, 3-hidroxi equinenona, asteroidenona, adonirubina, adonixantina y astaxantina con respecto a la cantidad total de carotenoides era menor de 10 % en masa. Los resultados del análisis de los compuestos carotenoides en estas dos cepas se muestran en las tablas 3 y 4.

20

25

Tabla 3

Compuesto carotenoide	Concentración de producto por disolución de cultivo, mg/l	Relación de producto % en masa
β -Caroteno	0,8	8,1
Equinenona	1,1	11,1
3-Hidroxi equinenona	0,0	0,0
Cantaxantina	7,0	70,7
Adonirubina	0,9	9,1
β -Criptoxantina	0,0	0,0
Astaxantina	0,1	1,0
Asteroidenona	0,0	0,0
Adonixantina	0,0	0,0
Zeaxantina	0,0	0,0

Tabla 4

Compuesto carotenoide	Concentración de producto por disolución de cultivo, mg/l	Relación de producto % en masa
β -Caroteno	0,6	5,5
Equinenona	0,7	6,4
3-Hidroxi equinenona	0,0	0,0
Cantaxantina	9,6	88,1
Adonirubina	0,0	0,0
β -Criptoxantina	0,0	0,0
Astaxantina	0,0	0,0
Asteroidenona	0,0	0,0
Adonixantina	0,0	0,0
Zeaxantina	0,0	0,0

Ejemplo 3

10 La cepa A-581-1 (FERM BP-4671, relación de cantaxantina producida: 5,3 % en masa) se mutó por irradiación con luz ultravioleta usando una lámpara UV. Se puso un medio (6 ml) que tenía la composición mostrada en la tabla 1 en un tubo de ensayo (diámetro interior: 18 mm) y se esterilizó con vapor a 121 °C durante 15 min para preparar un medio en el tubo de ensayo. Se inoculó cada uno de los 300 mutantes que se sometieron a aislamiento de colonia en un medio en tubo de ensayo mediante un bucle de inoculación, y se llevó a cabo cultivo en agitación recíproca (300 rpm) a 28 °C durante 4 días. Posteriormente, este producto de cultivo se centrifugó, y se analizó en las células resultantes los compuestos carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución. Como resultado, se obtuvo una cepa que presentaba una relación de cantaxantina de 60 % en masa o mayor con respecto a la cantidad total de carotenoides. Los resultados del análisis de los compuestos carotenoides en esta cepa se muestran en la tabla 5.

Tabla 5

Compuesto carotenoide	Concentración de producto por disolución de cultivo, mg/l	Relación de producto % en masa
β-Caroteno	0,2	8,7
Equinenona	0,3	13,0
3-Hidroxiéquinenona	0,0	0,0
Cantaxantina	1,5	65,2
Adonirubina	0,2	8,7
β-Criptoxantina	0,0	0,0
Astaxantina	0,1	4,3
Asteroidenona	0,0	0,0
Adonixantina	0,0	0,0
Zeaxantina	0,0	0,0

Aplicabilidad industrial

5 La presente invención proporciona un procedimiento para producir cantaxantina, que es barato, siempre estable y muy seguro.

LISTA DE SECUENCIAS

- 10 < 110 > Nippon Oil Corporation
- < 120 > Procedimiento para producir cantaxantina
- 15 < 130 > PH-1759CL
- < 140 >
- < 141 >
- 20 < 160 > 2
- < 170 > PatentIn Ver. 2.0
- 25 < 210 > 1
- < 211 > 1452
- < 212 > ADN
- 30 < 213 > Desconocido
- < 220 >
- 35 < 223 > Descripción del organismo desconocido: E-396
- < 400 > 1

ES 2 389 302 T3

agtttgatcc tggctcagaa cgaacgctgg cggcaggctt aacacatgca agtcgagcga 60
 gaccttcggg tctagcggcg gacgggtgag taacgcgtgg gaacgtgccc ttctctacgg 120
 aatagccccg ggaaactggg agtaataccg tatacgcctt ttgggggaaa gatttatcgg 180
 agaaggatcg gcccgcgttg gattaggtag ttggtggggt aatggcccac caagccgacg 240
 atccatagct ggittgagag gatgatcagc cacactggga ctgagacacg gccagactc 300

 ctacgggagg cagcagtggg gaatcctaga caatgggggc aaccctgatc tagccatgcc 360
 gcgtgagtga tgaaggcctt agggttgtaa agctctttca gctgggaaga taatgacggg 420
 accagcagaa gaagccccgg ctaactccgt gccagcagcc gcggtatac 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 acgccgtaa cgatgaatgc cagacgtcgg caagcatgct 780
 tgtcgggtgc acacctaacg gattaagcat tccgcctggg gagtacggtc gcaagattaa 840
 aactcaaagg aattgacggg ggcccgcaca agcgggtggag catgtggttt aattcgaagc 900
 aacgcgcaga accttaccaa cccttgacat ggcaggaccg ctggagagat tcagctttct 960
 cgtaagagac ctgcacacag gtgctgcatg gctgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttc 1020
 ggttaagtcc ggcaacgagc gcaaccacg tccctagtgt ccagcaattc agttgggaac 1080
 tctatggaaa ctgccgatga taagtcggag gaagggtgtg atgacgtcaa gtcctcatgg 1140
 gccttacggg ttgggctaca cacgtgctac aatgggtgtg acagtgggtt aatccccaaa 1200
 agccatctca gttcggattg tcctctgcaa ctcgagggca tgaagttgga atcgctagta 1260
 atcgcggaac agcatgccgc ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac cgcccgtcac 1320
 accatgggag ttggttctac ccgacgacgn tgcgctaacc ttcggggggc aggcggccac 1380
 ggtaggatca gcgactgggg tgaagtcgta acaaggtagc cgtaggggaa cctgcggctg 1440
 gatcacctcc tt 1452

- 5 < 210 > 2
- < 211 > 1426
- < 212 > ADN
- 10 < 213 > Desconocido
- < 220 >

ES 2 389 302 T3

< 223 > Descripción del organismo desconocido: E-581-1

< 400 > 2

5

```

tagagtttga tcctggctca gaacgaacgc tggcggcagg cttaacacat gcaagtcgag 60
cgagaccttc gggctctagcg gcggacgggt gagtaacgcg tgggaacgtg cccttctcta 120
cggaaatagcc ccgggaaact gggagtaata ccgtatacgc ctttggggg 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 ggcgactgg aaagtcagag 540
gtgaaatccc agggctcaac cttggaactg ctttgaaac tatcagtctg gagttcgaga 600
gaggtgagtg gaattccgag tgtagagggtg aaattcgtag atattcggag gaacaccagt 660
ggcgaaggcg gctcactggc tcgatactga cgctgagggtg cgaaagcgtg gggagcaaac 720
aggattagat accctggtag tccacgccgt aaacgatgaa tgccagacgt cggcaagcat 780
gcttgtcggg gtcacaccta acggattaag cattccgcct ggggagtacg gtcgcaagat 840
taaaactcaa aggaattgac gggggcccgc acaagcgggtg gagcatgtgg ttaattcga 900
agcaacgcgc agaaccttac caacccttga catggcagga ccgctggaga gattcagctt 960
tctcgtaa gaacctgcaca caggtgctgc atggctgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg 1020
ttcggttaag tccggcaacg agcgcgaacc acgtccctag ttgccagcat tcagttgggc 1080
actctatgga aactgccggt gataagccgg aggaagggtg ggatgacgtc aagtcctcat 1140
ggcccttacg gttgggcta cacacgtgct acaatggttg tgacagtggg ttaatccca 1200
aaagccatct cagttcggat tgtcctctgc aactcgaggg catgaagttg gaatcgctag 1260
taatcgcgga acagcatgcc gcggtgaata cgttcccggg cttgtacac accgcccgtc 1320
acaccatggg agttggttct acccgacgac gctgcgctaa cccttcgggg aggcaggcgg 1380
ccacggtagg atcagcgact ggggtgaagt cgtaacaagg tagcca 1426

```

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para obtener microorganismos que producen cantaxantina, que comprende las etapas de:
- 5 (i) inducir mutación en microorganismos que producen astaxantina que tienen una relación de aproximadamente 2 a 20 % en masa de cantaxantina producida respecto a la cantidad total de carotenoides producidos, en los que la secuencia de nucleótidos del ADN correspondiente a su ARN ribosómico 16S tiene una homología de 98 % o mayor con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, y
- 10 (ii) seleccionar un mutante que tenga una relación de al menos 60 % en masa de cantaxantina producida respecto a la cantidad total de carotenoides producidos.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que cada una de las relaciones de β -criptoxantina, zeaxantina, 3-hidroxi- β -ionol, astaxantina, adonirubina, adonixantina y astaxantina producidos a partir de
- 15 microorganismos que producen cantaxantina, es menor de 20 % en masa respecto a la cantidad total de carotenoides producidos.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que los microorganismos que producen astaxantina se seleccionan de la cepa E-396 (FERM BP-4283) y un mutante de la misma, y la cepa A-581-1 (FERM BP-4671) y
- 20 un mutante de la misma.
4. Un procedimiento para la producción microbiológica de cantaxantina que comprende cultivar microorganismos que producen cantaxantina obtenidos por un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y recuperar la cantaxantina producida.