(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 742 162**

(51) Int. CI.:

C12P 13/04	(2006.01)	***A61Q 19/08***	(2006.01)
A61K 8/44	(2006.01)	***C07C 249/14***	(2006.01)
A61K 8/99	(2007.01)	***C07C 251/20***	(2006.01)
A61K 31/198	(2006.01)	***C12N 15/09***	(2006.01)
A61K 35/74	(2015.01)	***C12N 1/21***	(2006.01)
A61P 17/02	(2006.01)	***C12R 1/465***	(2006.01)
A61P 17/16	(2006.01)	***A61K 36/064***	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)	***A61K 35/00***	(2006.01)
A61Q 17/04	(2006.01)	***A61K 36/00***	(2006.01)
A61Q 19/00	(2006.01)		

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.05.2015 PCT/JP2015/063682**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **19.11.2015 WO15174427**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2015 E 15792252 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 3144392**

(54) Título: **Método para producir aminoácidos tipo micosporina utilizando microbios**

(30) Prioridad:

13.05.2014 JP 2014099647

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.02.2020

(73) Titular/es:

THE KITASATO INSTITUTE (50.0%)
9-1, Shirokane 5-chome Minato-ku
Tokyo 108-8641 , JP y
NAGASE & CO., LTD. (50.0%)

(72) Inventor/es:

IKEDA, HARUO;
YAMAMOTO, SHOGO;
MATSUMOTO, JUN y
SOTA, MASAHIRO

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

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

Método para producir aminoácidos tipo micosporina utilizando microbios

Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para producir un aminoácido tipo micosporina utilizando un microorganismo, a un aminoácido tipo micosporina producido por el método y a un agente que absorbe el UV que comprende el aminoácido tipo micosporina.

Técnica antecedente

Se sabe que los rayos ultravioleta (UV) provocan reacciones cutáneas tales como eritema, envejecimiento de la piel y cáncer de piel. Los rayos ultravioleta contenidos en la luz solar se clasifican, en base a la longitud de onda, en tres tipos: UV-A (320 nm-400 nm), UV-B (280 nm-320 nm) y UV-C (200-280 nm). Entre ellos, los rayos UV que tienen un efecto sobre los cuerpos vivos son los UV-A y UV-B; mientras que el UV-C es inofensivo ya que normalmente no puede atravesar la atmósfera.

Se sabe que el UV-B es la causa principal de quemaduras solares en el exterior y tiene una energía relativamente mayor que el UV-A. Cuando el UV-B se absorbe por la capa de la piel, llega al estrato córneo y a la epidermis, y causa una pigmentación aguda de la piel tal como manchas y pecas. También se sabe que el UV-B causa inmunosupresión implicada en el envejecimiento y en la aparición de cáncer de piel.

El UV-A tiene una longitud de onda más larga que el UV-B y la energía es menor; sin embargo, el UV-A penetra en una parte más profunda de la piel que el UV-B y se sabe que llega a la dermis. Como resultado, no solo se produce una pigmentación cutánea aguda tal como manchas y pecas, sino también una reducción de la elasticidad de la dermis (elastosis actínica), con el resultado de que se induce el envejecimiento prematuro de la piel tal como arrugas y piel flácida. Asimismo, en los últimos años, se ha descubierto que el UV-A también causa inmunosupresión y está implicado en lesiones cutáneas precancerosas y en la aparición del cáncer de piel.

La cantidad de UV-B varía en función de, por ejemplo, la estación, el clima y la latitud; mientras que la cantidad de UV-A que alcanza la superficie de la Tierra es constante durante el año. Por lo tanto, también es importante proteger la piel del UV-A.

Los protectores de UV disponibles actualmente en el mercado se dividen en agentes que absorben el UV y agentes que dispersan el UV. Los agentes que absorben el UV convierten la energía del UV en energía térmica y la liberan, e incluyen, por ejemplo, un compuesto orgánico tal como el 4-*terc*-butil-4'-metoxidibenzoilmetano. Los agentes que dispersan el UV contienen una partícula inorgánica tal como el óxido de titanio (TiO_2) y el óxido de zinc (ZnO), y cuando se aplica el agente que dispersa el UV a la piel, las partículas inorgánicas presentes sobre la piel reflejan los rayos UV y sirven como una barrera para el UV.

Los agentes que absorben el UV tienen inconvenientes: (1) los agentes que absorben el UV se descomponen fácilmente por la luz y tienen poca estabilidad, (2) se produce excitación molecular y se acelera la producción de melanina que causa picores y alergia, y (3) dan una mala imagen a los usuarios debido a sustancias sintetizadas químicamente. Los agentes que dispersan el UV tienen los inconvenientes: (1) es probable que la piel se vea blanca cuando se aplican y el usuario tiende a sentir peso en la piel, (2) se induce la generación de oxígeno activo y (3) se cierran los poros de la piel y puede que se inhiba la respiración de la piel. A causa de estos inconvenientes, se ha esperado mucho el desarrollo de una sustancia de origen natural segura que absorba el UV.

Los aminoácidos tipo micosporina (de aquí en adelante denominados MAA) son sustancias naturales que absorben UV-A, que se sabe que están presentes en una amplia variedad de organismos acuáticos tales como el coral, algas rojas, vísceras de pescado y microalgas. Entre otros, se sabe que la sinorina es la sustancia natural más efectiva que absorbe el UV-A. Se ha intentado la síntesis química de un MAA; sin embargo, esta requiere procesos largos y complejos (Documento de Patente 1). Asimismo, se ha intentado la producción de un MAA mediante irradiación con luz de cianobacterias; sin embargo, la cantidad de producción de MAA es extremadamente baja (Documento no de Patente 1). Además, se ha intentado la extracción de MAA de productos naturales tales como el laver, algas y crustáceos; sin embargo, en estos casos no se ha obtenido un rendimiento suficiente (Documento de Patente 2 y Documentos no de Patente 2 a 4). Asimismo, la extracción y la producción a partir de productos naturales se ve fácilmente influenciada por las condiciones climáticas y en su mayoría inestables y, por tanto, es difícil obtener MAA de forma estable en una gran cantidad. Entretanto, se ha intentado la biosíntesis microbiana de MAA; sin embargo, estos procesos requieren la ruptura de células y la extracción con un disolvente orgánico para obtener MAA biosintetizados de las células microbianas (Documento de Patente 3 y Documentos no de Patente 5 y 6). Por tanto, la operación se vuelve complicada y se requiere una operación adicional para eliminar los desechos derivados de las células microbianas.

Listado de citas

Documentos de Patentes

Documento de Patente 1: WO02/39974
Documento de Patente 2: JP2013-518871A
Documento de Patente 3: JPH6-62878A

Documento no de Patente

Documento no de Patente 1: World J. Microbiol. Biotechnol. (2008) 24: 3111-3115
Documento no de Patente 2: Marine Biology 108, 157-166 (1991)
Documento no de Patente 3: Photomedicine and Photobiology (2002), 24, 39-42
Documento no de Patente 4: Tetraedro: Letters (1979), 3181-3182
Documento no de Patente 5: FEMS Yeast Res. (2011), 11: 52-59
Documento no de Patente 6: J. Bacteriol. (2011), 193 (21): 5923-5928

Resumen de la invención

Problema a resolver por la invención

Los problemas a resolver por la presente invención incluyen proporcionar un método para producir de forma estable y en gran cantidad una sustancia que absorbe el UV segura de origen natural.

Medios para resolver el problema

Los inventores han establecido un método para biosintetizar un MAA mediante el uso de un microorganismo que produce el MAA de forma extracelular, y obtener los MAA en una gran cantidad a partir de la solución de cultivo extracelular. Los inventores descubrieron que puede producirse un MAA de origen natural de manera más fácil y estable por este método que con los métodos convencionales, y han completado la presente invención.

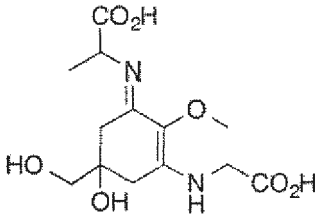
Es decir, la presente invención proporciona:

(1) un método para producir un aminoácido tipo micosporina, que comprende las etapas de:

cultivar un microorganismo que produce el aminoácido tipo micosporina de forma extracelular, aislar la solución de cultivo de células microbianas y la solución de cultivo extracelular, y
recuperar el aminoácido tipo micosporina de la solución de cultivo extracelular; como se desvela en las reivindicaciones adjuntas.

2) El método de acuerdo con (1), que comprende además una etapa de purificación del aminoácido tipo micosporina recuperado;
(3) el método de acuerdo con (1) o (2), en donde el microorganismo es un microorganismo que pertenece a *Escherichia coli*, levaduras, actinomicetos, microalgas o laberintúlidos;
(4) el método de acuerdo con (3), en donde el microorganismo es un actinomiceto;
(5) el método de acuerdo con (4), en donde el actinomiceto pertenece al género *Streptomyces,* al género *Actinosynnema,* al género *Pseudonocardia* o al género *Corynebacterium;*
(6) el método de acuerdo con (3), en donde el microorganismo es un laberintúlido y pertenece al género *Aurantiochytrium;*
(7) el método de acuerdo con (3), en donde el microorganismo es una levadura y pertenece al género *Saccharomyces;*
(8) el método de acuerdo con cualquiera de los pasos (1) a (7), en donde el microorganismo comprende genes heterólogos de enzimas biosintéticas de aminoácidos tipo micosporina;
(9) el método de acuerdo con (8), en donde los genes de la enzima biosintética de aminoácidos tipo micosporina están compuestos por los genes amir_4256, amir_4257, amir_4258 y amir_4259 derivados de *Actinosynnema mirum;*
(10) el método de acuerdo con (8), en donde un codón de al menos un gen de los genes de la enzima biosintética de aminoácidos tipo micosporina se modifica para un microorganismo en el que se va a introducir el gen;
(11) El método de acuerdo con (9) o (10), en donde el microorganismo es *Streptomyces avermitilis* MA-4680 (número de ingreso NITE: NBRC 14893), *Streptomyces lividans* 1326 (NITE número de ingreso: NBRC 15675), *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 (NITE número de ingreso: NBRC 12168), *Aurantiochytrium* sp. SAM2179 (FERM BP-5601), *Escherichia coli* JM109 o *Saccharomyces cerevisiae* YPH499XW;
También se desvela:
(12) un aminoácido tipo micosporina representado por la fórmula 1:

[Compuesto 1]



(Fórmula 1);

(13) el aminoácido tipo micosporina de acuerdo con (12), producido por el método de acuerdo con uno cualquiera de los pasos (1) a (11);
(14) una composición que absorbe el UV que comprende un aminoácido tipo micosporina producido por el método de acuerdo con uno cualquiera de los pasos (1) a (11) o el aminoácido tipo micosporina de acuerdo con (12) o (13) y un componente aceptable para cosméticos, cuasimedicamentos o productos farmacéuticos; y
(15) una composición para prevenir al menos un síntoma o enfermedad seleccionada del grupo que consiste en reacciones cutáneas agudas, envejecimiento de la piel y cáncer de piel, que comprende un aminoácido tipo micosporina producido por el método de acuerdo con uno cualquiera de los pasos (1) a (11) o el aminoácido tipo micosporina de acuerdo con (12) o (13) y un componente aceptable para cosméticos, cuasimedicamentos o productos farmacéuticos.

Efectos de la invención

De acuerdo con la presente invención, es posible producir un MAA de forma más fácil que una síntesis química convencional complicada que tiene muchas etapas. También es posible obtener un MAA en una cantidad mayor que con los métodos convencionales de obtención de MAA de un producto natural como el laver y los crustáceos. Por tanto, Se puede producir un MAA de forma estable. Además, como se puede obtener un MAA a partir de una solución de cultivo extracelular, la etapa de purificación se simplifica en comparación con los métodos de obtención de MAA por ruptura de una célula microbiana. Como resultado, se puede obtener rápidamente un MAA altamente purificado con un alto rendimiento.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra las cantidades de sinorina y porphyra-334 producidas por *Streptomyces avermitilis* MA-4680 (número de ingreso NITE: NBRC 14893) en comparación con la producción en la solución de cultivo extracelular y en las células microbianas. (A) Sinorina; (B) Porphyra-334. Línea continua-círculo blanco: Solución de cultivo extracelular; Línea discontinua-círculo negro: Células microbianas.
La Figura 2 muestra los cambios temporales de las concentraciones de sinorina y porphyra-334, en una solución de cultivo extracelular de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 (NITE número de ingreso: NBRC 12168). Triángulo negro: Sinorina; Triángulo blanco: Porphyra-334.

Descripción de las realizaciones

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para producir un MAA que comprende las etapas de: cultivar un microorganismo que produce el MAA de forma extracelular; aislar la célula microbiana y la solución de cultivo extracelular; y recuperar el MAA de la solución de cultivo extracelular.

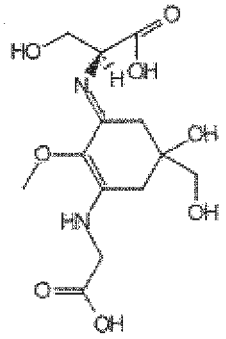
De acuerdo con el método de la presente invención, se obtiene un MAA a partir de un sobrenadante de un cultivo de un microorganismo. Por tanto, el MAA se puede obtener en una cantidad mayor que los métodos convencionales utilizando un producto natural. Además, el método de la presente invención no requiere una etapa de ruptura de una célula microbiana. Por tanto, el tiempo y el coste pueden reducirse en comparación con los métodos convencionales de extracción de MAA mediante ruptura de productos naturales tales como las algas. En un método que comprende una etapa de alteración, los contaminantes resultantes de la ruptura se transportan en procesos posteriores y complican los siguientes procesos de purificación. Sin embargo, en el método de la presente invención, tal transporte de contaminantes se puede prevenir, con el resultado de que los procesos de purificación posteriores pueden simplificarse. Como resultado, pueden reducirse tanto el tiempo como el coste necesarios para la purificación.

En la presente invención, la expresión "aminoácido tipo micosporina (en lo sucesivo denominado MAA)" es una expresión general de un compuesto que tiene un esqueleto de ciclohexenona o ciclohexanamina (que opcionalmente tiene un sustituyente) al que se une/unen aminoácidos.

Los ejemplos de MAA incluyen, aunque no de forma limitativa, sinorina (la fórmula 2 siguiente), porphyra-334 (la

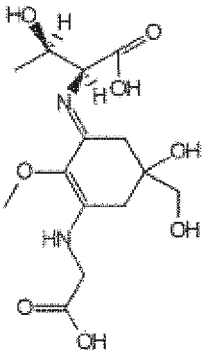
fórmula 3 siguiente), asterina-330 (la fórmula 4 siguiente), paliteno (la fórmula 5 siguiente), palitino (la fórmula 6 siguiente), micosporina-glicina (la fórmula 7 siguiente), micosporina-glicina:valina (la fórmula 8 siguiente) y micosporina serinol (la fórmula 9 siguiente).

[Compuesto 2]



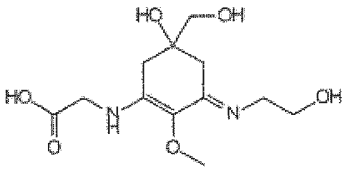
(Fórmula 2)

[Compuesto 3]



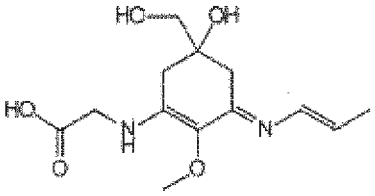
(Fórmula 3)

[Compuesto 4]



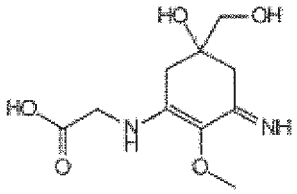
(Fórmula 4)

[Compuesto 5]



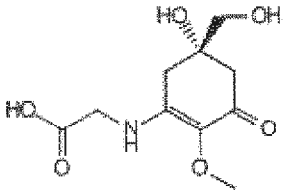
(Fórmula 5)

[Compuesto 6]



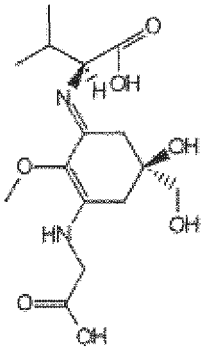
(Fórmula 6)

[Compuesto 7]



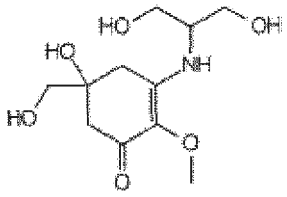
(Fórmula 7)

[Compuesto 8]



(Fórmula 8)

[Compuesto 9]



(Fórmula 9)

Como se usa en el presente documento, los ejemplos del "microorganismo (microbio)" incluyen, aunque no de forma limitativa, bacterias tales como actinomicetos, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis;*hongos tales como mohos y levaduras; microalgas tales como cianobacterias; y laberintúlidos.

El término "actinomiceto" se refiere a una bacteria gram positiva que pertenece a las *Actinobacteria.* Los ejemplos de "actinomiceto" incluyen, por ejemplo, el género *Streptomyces* tal como *Streptomyces lividans, Streptomyces violaceoruber, Streptomyces* coelicolor, Streptomyces *avermitilis* y*Streptomyces griseus;* el género *Actinosynnema* tal como *Actinosynnema pretiosum* y *Actinosynnema mirum;* el género *Pseudonocardia* tal como *Pseudonocardia autotrophics, Pseudonocardia thermophila;*y al género *Corynebacterium* tal como *Corynebacteriumglutamicum.* Los actinomicetos pueden aislarse de, por ejemplo, suelo, u obtenerse de instituciones depositarias de microorganismos.

Las "levaduras" incluyen las levaduras ascosporógenas, levaduras basidiosporógenas y levaduras pertenecientes a los hongos imperfectos. Los ejemplos de levaduras incluyen, por ejemplo, el género *Saccharomyces* tal como *Saccharomyces cerevisiae;* el género *Schizosaccharomyces* tal como *Schizosaccharomyces pombe;* el género *Phaffia* tal como *Phaffia* rhodozyma; el género *Kluyveromyces* tal como *Kluyveromyces marxianus;* el género *Yarrowia* tal como *Yarrowia lipolytica;* el género Pichia tal como *Pichia stipitis;* y el género *Candida* tal como *Candida utilis.* Las levaduras pueden aislarse por ejemplo, de plantas, animales y suelo, u obtenerse de instituciones depositarias de microorganismos.

El término "microalgas" se refiere a algas que tienen una estructura microscópica, excepto las algas marinas que son organismos multicelulares. El término "algas" se refiere a todos los organismos fotosintéticos oxigenados, excepto los musgos, helechos y plantas de semilla que viven principalmente en el suelo. Las algas incluyen varios organismos unicelulares y pluricelulares. Por ejemplo, las algas incluyen algas marinas; *Cyanobacteria* pertenecientes a los procariotas; y *Glaucophyta, Rhodophyta* (algas rojas) y *Chlorophyta* pertenecientes a los eucariotas. Las microalgas también incluyen un cuerpo grupal formado por una pluralidad de células. Las microalgas no siempre viven en el agua y se incluye a aquellas que viven en el suelo o en la superficie corporal de los animales. Los ejemplos de *"Cyanobacteria"*incluyen, por ejemplo, *Anabaena variabilis, Nostocpunctiforme, Nostoclinckia, Nostoccommune, Nostoc verrucosum* y *Nostoc muscorum.* Las *Cyanobacteria* pueden aislarse de la naturaleza u

obtenerse de instituciones depositarias de microorganismos.

El "laberintúlido" es un eucariota ameboide incluido en los estramenopilos. Los ejemplos de laberintúlidos incluyen, por ejemplo, el género *Aurantiochytrium,* al género *Schizochytrium,* el género *Thraustochytrium* y el género *Ulkenia.* Los laberintúlidos pueden aislarse de la naturaleza, tal como las algas marinas y las plantas terrestres, u obtenerse de instituciones depositarias de microorganismos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "microorganismo que produce de forma extracelular un aminoácido tipo micosporina (microbios que producen MAA en el exterior de células bacterianas)" se refiere a un microorganismo que tiene la capacidad de biosintetizar y producir un MAA de forma extracelular, por ejemplo, un microorganismo que tiene un gen de enzima biosintética de MAA. Tal "microorganismo que produce de forma extracelular un MAA" puede ser una cepa de tipo salvaje o mutada artificialmente. Los ejemplos de un tratamiento de mutación artificial incluyen recombinación genética, irradiación con UV, irradiación de rayos X y tratamiento con un agente de mutagénesis. Asimismo, el microorganismo que produce de forma extracelular un MAA puede ser un mutante espontáneo. El "microorganismo que produce de forma extracelular el MAA" incluye un microorganismo que tiene un gen de enzima biosintética de MAA homólogo o heterólogo. Por ejemplo, se puede usar un microorganismo en el que se introduce un gen de enzima biosintética de MAA heterólogo por recombinación genética. Para introducir un gen heterólogo en un microorganismo, se puede utilizar un método ampliamente conocido en la técnica.

En el caso de que un gen de enzima biosintética de MAA homólogo o heterólogo se introduzca en un microorganismo por recombinación genética, por ejemplo, un promotor, una región no traducida (UTR) 5', un gen marcador para la selección de transformantes, una región no traducida (UTR) 3', o una parte de la misma. En este caso, se puede usar un promotor, etc. ampliamente conocido por los expertos en la materia como los utilizados en el microorganismo. Asimismo, un codón del gen puede modificarse apropiadamente dependiendo del uso de codones en el microorganismo en el que se va a introducir el gen de enzima biosintética de MAA. El uso de codones en un microorganismo puede verificarse por los expertos en la materia, por ejemplo, mediante el uso de la base de datos de uso de codones (http://www.kazusa.or.jp/codon/) del Instituto de Investigación de ADN de Kazusa. Como alternativa, El uso de codones puede verificarse mediante el uso del programa de diseño de secuencias de genes, GeneOptimizer (R) proporcionado por GENEART AG, etc. Además, basándose en la información del uso de codones así obtenida, el codón de un gen en cuestión puede optimizarse mediante una práctica habitual.

Los ejemplos del gen de la enzima biosintética de aminoácidos tipo micosporina incluyen, aunque no de forma limitativa, los genes amir_4256 (SEQ ID NO: 1), amir_4257 (SEQ ID NO: 2), amir_4258 (SEQ ID NO: 3) y amir_4259 (SEQ ID NO: 4) derivados de *Actinosynnema mirum* DSM43827; genes pseP1_010100031425 (SEQ ID NO: 5), pseP1_010100031430 (SEQ ID NO: 6), pseP1_010100031435 (SEQ ID NO: 7) y pseP1_010100031440 (SEQ ID NO: 8) derivados de *Pseudonocardia* sp. P1; Ava3855, Ava3856, Ava3857 y Ava3858 derivados de *Anabaena variabilis* ATCC29413 (véase, Balskus EP et al., Science, (2010), 329: 1653-1656); y genes mysA, mysB, mysC y mysD derivados de *Nostoc punctiforme* ATCC29133 (véase, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Nov. 2011, vol. 193, No. 21, p. 5923-5928). Por ejemplo, en una realización en la que se usa un laberintúlido, se usa el gen amir_4256 de codones optimizados (SEQ ID NO: 9), amir_4257 de codones optimizados (SEQ ID NO: 10), amir_4258 de codones optimizados (SEQ ID NO: 11) y amir_4259 de codones optimizados (SEQ ID NO: 12) como genes de enzimas biosintéticas de aminoácidos tipo micosporina.

En una realización de la presente invención, el microorganismo que se usa en el presente documento es un microorganismo perteneciente a *Escherichia coli,* levaduras, actinomicetos, microalgas o laberintúlidos. Por ejemplo, el microorganismo que se usa en el presente documento es un microorganismo perteneciente a *Escherichia coli,* levaduras, actinomicetos o laberintúlidos.

En una realización donde se usa un actinomiceto, se usa un microorganismo perteneciente al género *Streptomyces,* al género *Actinosynnema,* al género *Pseudonocardia* o al género *Corynebacterium*. En otra realización, se usa un microorganismo perteneciente al género *Streptomyces* o al género *Corynebacterium*. En otra realización, *se usa Streptomyces lividans, Streptomyces avermitilis* o *Corynebacterium glutamicum*. En otra realización más, Se usa un actinomiceto que comprende, los genes amir_4256, amir_4257, amir_4258 y amir_4259 derivados de *Actinosynnema mirum*. Por ejemplo, *Streptomyces avermitilis* MA-4680 (NITE número de ingreso: NBRC 14893, depositado en el Depositario de Microorganismos de Patentes (NPMD), Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación (NITE), ubicado en 2-5-8, Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, Japón); *Streptomyces lividans* 1326 (NITE número de ingreso: NBRC 15675, depositado en el Depositario de Microorganismos de Patentes (NPMD), Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación (NITE), ubicado en 2-5-8, Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, Japón); o se usa *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 (NITE número de ingreso: NBRC 12168, depositado en el Depositario de Microorganismos de Patentes (NPMD), Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación (NITE), ubicado en 2-5-8, Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, Japón), que comprende los genes amir_4256 (SEQ ID NO: 1), amir_4257 (SEQ ID NO: 2), amir_4258 (SEQ ID NO: 3) and amir_4259 (SEQ ID NO: 4) derivados de *Actinosynnema mirum,*.

En una realización donde se usa un laberintúlido, se usa un microorganismo perteneciente al género *Aurantiochytrium,* al género *Schizochytrium,* al género *Thraustochytrium* o al género *Ulkenia*. En otra realización, se

usa un microorganismo perteneciente al género *Aurantiochytrium*. En otra realización, se usa un laberintúlido que comprende los genes amir_4256 (SEQ ID NO: 1), amir_4257 (SEQ ID NO: 2), amir_4258 (SEQ ID NO: 3) y amir_4259 (SEQ ID NO: 4) derivados de *Actinosynnema mirum*. En otra realización más, se usa un laberintúlido que comprende los genes de codones modificados (para laberintúlidos) amir_4256, amir_4257, amir_4258 y amir_4259. En otra realización, *Aurantiochytrium* sp. SAM2179 (FERM BP-5601) que comprende los genes de codones modificados (para laberintúlidos) amir_4256, amir_4257, amir_4258 y amir_4259 (debe tenerse en cuenta que esta cepa se depositó como *Ulkenia* sp. SAM2179, y la clasificación de esta cepa se modificó en una fecha posterior después de la finalización de la secuenciación del genoma).

En una realización donde se usa una levadura, se usa un microorganismo perteneciente al género *Saccharomyces,* al género *Schizosaccharomyces,* al género *Phaffia,* al género *Kluyveromyces,* al género *Yarrowia,* al género *Pichia* o al género *Candida*. En otra realización, se usa un microorganismo perteneciente al género *Saccharomyces*. En otra realización, se usa una levadura que tiene un gen de asimilación de xilosa. En otra realización más, se usa una levadura que comprende los genes amir_4256 (SEQ ID NO: 1), amir_4257 (SEQ ID NO: 2), amir_4258 (SEQ ID NO: 3) y amir_4259 (SEQ ID NO: 4) derivados de *Actinosynnema mirum* DSM43827. En otra realización, se usa *Saccharomyces cerevisiae* YPH499XW que tiene un gen de asimilación de xilosa y que comprende los genes amir_4256 (SEQ ID NO: 1), amir_4257 (SEQ ID NO: 2), amir_4258 (SEQ ID NO: 3) y amir_4259 (SEQ ID NO: 4) derivados de *Actinosynnema mirum* DSM43827.

En una realización donde se usa *Escherichia coli*, se usa *Escherichia coli* que comprende los genes amir_4256 (SEQ ID NO: 1), amir_4257 (SEQ ID NO: 2), amir_4258 (SEQ ID NO: 3) y amir_4259 (SEQ ID NO: 4) derivados de *Actinosynnema mirum* DSM43827. En otra realización, se usa *Escherichia coli* JM109 que comprende los genes amir_4256 (SEQ ID NO: 1), amir_4257 (SEQ ID NO: 2), amir_4258 (SEQ ID NO: 3) y amir_4259 (SEQ ID NO: 4) derivados de *Actinosynnema mirum* DSM43827.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula microbiana" se refiere a una célula de un microorganismo. Además, como se usa en el presente documento, la expresión "solución de cultivo extracelular (fluido)" se refiere a una parte obtenida al eliminar la célula microbiana de la solución de cultivo obtenida al cultivar un microorganismo. Es decir, la solución de cultivo extracelular comprende varios componentes contenidos en el medio de cultivo utilizado en el cultivo y sustancias producidas por un microorganismo durante el cultivo.

Los expertos en la materia seleccionan apropiadamente un método para aislar una célula microbiana y una solución de cultivo extracelular. Por ejemplo, una célula microbiana y una solución de cultivo extracelular pueden aislarse sometiendo a la solución de cultivo obtenida mediante el cultivo de un microorganismo a centrifugación. Las condiciones de centrifugación tales como la temperatura, el tiempo y la velocidad varían dependiendo del tipo de microorganismo y de las condiciones bien conocidas por los expertos en la materia. Como alternativa, una solución de cultivo extracelular y de células microbianas se puede aislar filtrando la solución de cultivo obtenida cultivando un microorganismo mediante el uso de una membrana de filtración apropiada. Como alternativa, las células microbianas pueden agregarse con la ayuda de un agente de agregación apropiado y después someterse a centrifugación o filtración.

Recuperar un MAA de una solución de cultivo extracelular se refiere a obtener un líquido que contiene principalmente un MAA mediante la eliminación de varios componentes contenidos en el medio de cultivo utilizado en el cultivo que a su vez están contenidos en la solución de cultivo extracelular y sustancias excepto el MAA producido por el microorganismo durante el cultivo. Los expertos en la materia también seleccionan apropiadamente un método para recuperar un MAA de una solución de cultivo extracelular. Por ejemplo, se puede recuperar un MAA de una solución de cultivo extracelular mediante filtración con una membrana o usando un medio apropiado. Los expertos en la materia seleccionan el medio de forma apropiada. En una realización preferente, se utiliza un disolvente acuoso. Los ejemplos del disolvente acuoso incluyen, aunque no de forma limitativa, una solución acuosa ácida, neutra o alcalina o una solución acuosa que contiene una sal.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el método mencionado anteriormente que comprende además una etapa de purificación del MAA recuperado. Para la purificación de MAA, se puede usar un método para purificar un metabolito de un cultivo de un microorganismo que es bien conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, se puede obtener un MAA purificado por extracción con un disolvente orgánico, un tratamiento con carbono activado, filtración en gel, cromatografía en columna de intercambio iónico, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cristalización y/o electrodiálisis.

En la presente invención, puede neutralizarse un medio de cultivo, si fuera necesario. Como neutralizador, pueden usarse los conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, un carbonato tal como el carbonato de calcio, carbonato de magnesio, carbonato de sodio e hidrogenocarbonato de sodio; un hidróxido tal como el hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio e hidróxido de magnesio; amoniaco; cal viva, caliza y cal hidratada. En una realización, el neutralizador usado en la presente invención es un carbonato tal como carbonato de calcio, carbonato de magnesio e hidrogenocarbonato de sodio. El neutralizador puede agregarse a un medio de cultivo antes o durante el cultivo. El neutralizador puede agregarse de forma continua o intermitente. La cantidad de adición de neutralizador se puede determinar fácilmente midiendo el pH del medio de cultivo. El pH del medio de cultivo puede

medirse mediante un método convencionalmente conocido, por ejemplo, mediante un pH-metro.

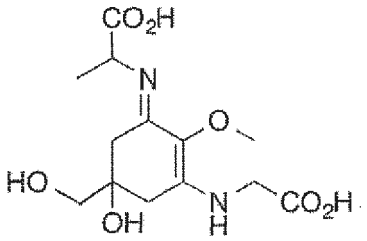
En la presente invención, el medio de cultivo y otras condiciones de cultivo (por ejemplo, temperatura, tiempo, pH, agitación o no) para cultivar un microorganismo pueden seleccionarse apropiadamente por los expertos en la materia dependiendo del tipo de microorganismo a cultivar.

En el caso donde se usa un actinomiceto, por ejemplo, un medio semisintético para un actinomiceto (6 % de glucosa, 0,2 % de NaCl, 0,05 % de K_2HPO_4, 0,01 % de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2 % de $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 % de extracto de levadura, 0,005 % de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,005 % de $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0,005 % de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 % de $CaCO_3$), Medio de cultivo TSB (0,25% de glucosa, 1,7% de digerido pancreático de caseína, 0,3 % de digerido papaico de soja, 0,5 % de NaCl, 0,25 % de K_2HPO_4), o medio de cultivo SYN (0,7 % de casaminoácido, 0,2 % de extracto de levadura, 0,264 % de $(NH_4)_2SO_4$, 0,238 % de KH_2PO_4, 0,556 % de K_2HPO_4, 0,1 % de $MgSO_4$ $7H_2O$, 0,0064 % de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,0011 % de $FeSO_4$ $7H_2O$, 0,0079 % de $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0,0015 % de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 % de $CaCO_3$). En el caso donde se usa *Escherichia coli*, por ejemplo, puede usarse medio de cultivo LB, medio de cultivo YT 2 x, medio de cultivo NYZ, medio de cultivo M9, medio de cultivo SOC o medio de cultivo YPD. En el caso donde se usa una levadura, por ejemplo, puede usarse medio de cultivo SD, medio de cultivo YPD o medio de cultivo YPAD.

El medio de cultivo anterior puede modificarse apropiadamente para mejorar el estado de cultivo del microorganismo. Por ejemplo, el medio de cultivo puede modificarse aumentando la concentración inicial de glucosa en el medio de cultivo o agregando una solución de oligoelementos (x200) ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 64 mg, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 11 mg, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 79 mg, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 15 mg/50 ml).

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un MAA producido por el método antes mencionado de la presente invención. El MAA producido por la presente invención no se limita a los MAA cuyas estructuras ya están determinadas, sino que puede incluirse un MAA cuya estructura está recién determinada. En una realización, el MAA precedente puede ser sinorina, porphyra-334, palitina, micosporina serinol o micosporina glicina, o cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos de MAA que tienen una nueva estructura incluyen micosporina-glicina-alanina (la fórmula 10 siguiente). Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona micosporina-glicina-alanina. En otra realización, la presente invención proporciona micosporina-glicina-alanina producida por el método mencionado anteriormente de la presente invención.

[Compuesto 10]



(Fórmula 10)

Como método para identificar un MAA, se puede usar un método convencionalmente conocido. Por ejemplo, se puede utilizar la cromatografía líquida de alto rendimiento con espectrometría de masas de tiempo de vuelo (HPLC-TOFMS). Del mismo modo, como método para identificar un nuevo MAA, se puede usar un método convencionalmente conocido. Por ejemplo, se puede identificar un nuevo MAA mediante espectrometría de masas de alta resolución (HR-MS) y en combinación con resonancia magnética nuclear (RMN). Como alternativa, se puede identificar un MAA utilizando HPLC basado en el tiempo de retención y los resultados de un espectro UV. Como alternativa, se puede identificar un nuevo MAA midiendo un espectro de absorción UV y una masa precisa mediante el uso de un aparato HPLC equipado con un detector de matriz de fotodiodos y un detector HR-MS.

La presente divulgación proporciona además una composición que absorbe el UV que comprende una cantidad eficaz de MAA producida por el método de la presente invención o micosporina-glicina-alanina como se menciona anteriormente como ingrediente activo y otro componente aceptable para cosméticos, cuasimedicamentos o productos farmacéuticos. La composición que absorbe el UV de la presente invención puede usarse no solo en los campos de la cosmética y la farmacia, sino también como una composición de pintura y otro agente de recubrimiento. Por ejemplo, en el caso en el que la composición que absorbe el UV de la presente invención se aplique a la piel humana, la composición puede comprender el MAA producido por el método de la presente invención en una cantidad de aproximadamente el 0,05 al 10% en peso, un medio de fase oleosa (aproximadamente del 5 al 40% en peso), un emulsionante (aproximadamente del 1 al 10% en peso), una pequeña cantidad de un agente auxiliar y un medio de fase acuosa tal como agua.

La presente divulgación proporciona además una composición, para prevenir al menos un síntoma o enfermedad seleccionada del grupo que consiste en reacciones cutáneas agudas, envejecimiento de la piel y cáncer de piel, que comprende un MAA producido por el método de la presente invención o micosporina-glicina-alanina como se menciona anteriormente y un componente aceptable para cosméticos, cuasimedicamentos o productos farmacéuticos. La composición comprende una cantidad efectiva de MAA producida por el método de la presente invención como ingrediente activo.

La composición como se mencionó anteriormente puede prepararse en la forma que pueden tomar cosméticos o productos farmacéuticos comunes para la aplicación en la piel, tal como una crema, loción, pasta, pomada, emulsión (emulsión de aceite en agua, emulsión de agua en aceite, emulsión múltiple, microemulsión, emulsión PET, emulsión Pickering), gel (hidrogel, gel de alcohol), suspensión, espuma, pulverización, comprimido o polvo.

Los ejemplos del componente que puede estar comprendido en la composición como se mencionó anteriormente y aceptable para cosméticos, cuasimedicamentos o productos farmacéuticos incluyen auxiliares y aditivos de cosméticos comunes, cuasimedicamentos o productos farmacéuticos, por ejemplo, un conservante tal como el cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, cloruro de hexametonio, alcohol butílico, alcohol bencílico, alquil parabenos tal como metil parabeno o propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol y m-cresol; un antioxidante tal como ácido ascórbico y metionina; un tampón tal como el ácido fosfórico, ácido cítrico y otros ácidos orgánicos; un emulsionante tal como un éster de sorbitán, Tween (R), poliol de silicio, estearato de potasio y un éster de ácido graso etoxilado; un estabilizador de emulsión; polímero aniónico, catiónico, no iónico o anfótero; agentes quelantes, tales como el EDTA; un medio de fase oleosa (un aceite a base de hidrocarburos tales como un aceite mineral, una cera de parafina, un aceite natural, un aceite de silicona, un éster de ácido graso tal como palmitato de isopropilo, un alcohol graso tal como alcohol estearílico); un espesante; un humectante; un emoliente; un tensioactivo tal como el polietilenglicol (PEG); un agente acidificante o basificante; un aromatizante; una fragancia; un tinte; un agente colorante; u otros componentes generalmente combinados en cosméticos, cuasimedicamentos o productos farmacéuticos.

Ejemplos

La presente invención se describirá en detalle y específicamente por medio de ejemplos; sin embargo, se proporcionan solo con fines ilustrativos y no deben considerarse limitantes de la presente invención.

(Ejemplo 1)

1. Producción de MAA usando *Streptomyces*

Los presentes inventores produjeron MAA usando *Streptomyces lividans* y *Streptomyces avermitilis.* Además, los presentes inventores compararon la cantidad de producción de MAA con respecto a la producción en una solución de cultivo extracelular y en células microbianas (Figura 1).

1-1. Introducción de genes de enzimas biosintéticas de MAA

1-1-1. Introducción de genes de enzimas biosintéticas de MAA en *Streptomyces lividans*

Como genes de enzimas biosintéticas de MAA, se utilizaron los genes amir_4256 (SEQ ID NO: 1), amir_4257 (SEQ ID NO: 2), amir_4258 (SEQ ID NO: 3) y amir_4259 (SEQ ID NO: 4) derivados de *Actinosynnema mirum* DSM43827. Estos genes se ligaron a un vector que tenía un pIJ101 ori bajo el control del promotor PLD (véase el documento JP2002-51780A) para preparar un vector de expresión génica. *Streptomyces lividans* 1326 (NITE número de ingreso: NBRC 15675) se transformó con el vector de expresión génica para obtener una cepa productora de MAA. *Streptomyces lividans* se transformó de acuerdo con un método convencionalmente conocido.

1-1-2. Introducción de genes de enzimas biosintéticas de MAA en *Streptomyces avermitilis*

Los genes anteriormente mencionados: amir_4256 (SEQ ID NO: 1), amir_4257 (SEQ ID NO: 2), amir_4258 (SEQ ID NO: 3) y amir_4259 (SEQ ID NO: 4), se introdujeron en *Streptomyces avermitilis* MA-4680 (número de ingreso NITE: NBRC 14893) por recombinación homóloga para obtener una cepa productora de MAA. La recombinación homóloga de *Streptomyces avermitilis* se realizó de acuerdo con un método convencionalmente conocido.

1-2. Precultivo de *Streptomyces lividans* y *Streptomyces avermitilis*

Se añadió una solución madre de glicerol de una espora de *Streptomyces lividans* 1326 o *Streptomyces avermitilis* MA-4680, que se preparó en la Sección 1-1 anterior y que tiene los genes de enzimas biosintéticas de MAA, a 5 ml de medio de cultivo AVM (véase la Tabla 1 siguiente). Estos actinomicetos se cultivaron a 28 °C y se agitaron a 160 rpm durante 48 horas.

[Tabla 1]

Medio de cultivo AVM (pH 7,5)	
Glucosa	5 g (0,5 %)
Harina de soja	15 g (1,5 %)
Extracto de levadura	5 g (0,5 %)
Total	1000 ml

1-3. Cultivo principal de *Streptomyces lividans* y *Streptomyces avermitilis*

La solución de precultivo (una cantidad correspondiente al 0,1%) se añadió a 50 ml de medio de cultivo TSBt (véanse las tablas 2 a 4 siguientes) contenido en un matraz con deflector de 500 ml. Se añadió más glucosa al medio de cultivo TSBt al comienzo del cultivo, de modo que la concentración inicial de glucosa pasó a ser 50 g/l. Estas cepas se cultivaron a 28 °C y se agitaron a 160 rpm durante dos semanas.

[Tabla 2]

Medio de cultivo TSB	
Digerido pancreático de caseína	17 g (1,7 %)
Digerido papaico de soja	3 g (0,3 %)
Glucosa	25 g (0,25 %)
NaCl	5 g (0,5 %)
K_2HPO_4	2,5 g (0,25 %)
Total	1000 ml

[Tabla 3]

Medio de cultivo TSBt	
Medio de cultivo TSB	50 ml
Solución de oligoelementos (x200)	0,25 ml (cantidad correspondiente al 0,5%)

[Tabla 4]

Solución de oligoelementos (x200)	
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	64 mg
$FeSO_4 \cdot 5H_2O$	11 mg
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	79 mg
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	15 mg
Total	50 ml

1-4. Medición del MAA

Durante el cultivo principal, se tomó una muestra de 1 ml de la solución de cultivo en un tiempo predeterminado y se midió la turbidez de la solución de cultivo muestreada a 600 nm. La solución de cultivo muestreada se centrifugó a 14000 rpm durante 20 minutos para aislar la solución de cultivo extracelular y un precipitado (células microbianas). La solución de cultivo extracelular aislada se usó como una muestra de solución de cultivo extracelular. Se añadió metanol (1 ml) a las células microbianas aisladas, y las células microbianas se alteraron mediante agitación y luego se sometieron a centrifugación para recuperar el sobrenadante (muestra de células microbianas). Las cantidades de producción de sinorina y porphyra-334 en cada una de las muestras de solución de cultivo extracelular y las muestras de células microbianas diluidas se midieron mediante HPLC. Las condiciones de medición de HPLC son las que se muestran en la siguiente tabla.

[Tabla 5]

Columna:	HYPERCARB (R) (3 µm; 2,1 ϕ mm x 100 mm) (fabricado por Thermo Scientific)
Disolvente:	Disolvente A: Sal acetato de trietilamina 0,1 M (TEAA) Disolvente B: 100% acetonitrilo
Condiciones de gradiente:	0-4 minutos de disolvente B 6 % 4-10 minutos de gradiente linear de disolvente B 6-15 % 10-15 minutos de gradiente linear de disolvente B 15-80 % 15-20 minutos de gradiente linear de disolvente B 80-6 % 20-35 minutos de disolvente B 6 %
Longitud de onda de detección:	334 nm
Muestra patrón:	Sinorina: fabricado por Mibelle AG Biotechnology Nombre del producto: Helioguard 365
	Porphyra-334: fabricado por Mibelle AG Biotechnology Nombre del producto: Helioguard 365
Caudal:	0,2 ml/minuto
Tiempo de retención:	Sinorina: alrededor de 6 minutos Porphyra-334: alrededor de 5 minutos

1-5. Resultados

Los resultados de *Streptomyces avermitilis* MA-4680 se muestran en la Figura 1. La Figura 1 (A) muestra la distribución de sinorina; mientras que la Figura 1 (B) muestra la distribución de porphyra-334. Se verificó que tanto la sinorina como el porphyra-334 están distribuidos más ampliamente en la solución de cultivo extracelular que en las células microbianas. A partir de estos resultados, se demostró que la cantidad de producción de sinorina en la solución de cultivo extracelular es aproximadamente 5 veces mayor que la cantidad de producción en células microbianas a las dos semanas del inicio del cultivo. Del mismo modo, se demostró que la cantidad de producción de porphyra-334 en la solución de cultivo extracelular es aproximadamente 7 veces mayor que la cantidad de producción en las células microbianas. En *Streptomyces lividans* 1326, la cantidad de producción extracelular de sinorina fue de 150 mg/l y la cantidad de producción intracelular fue de 50 mg/l pasada aproximadamente una semana desde el inicio del cultivo. La cantidad de producción extracelular de la misma fue de 510 mg/l y la cantidad de producción intracelular de la misma fue de 105 mg/l a aproximadamente dos semanas desde el inicio del cultivo.

(Ejemplo 2)

2. Producción de un MAA nuevo (micosporina-glicina-alanina)

2-1. La *Streptomyces avermitilis* que produce un MAA se cultivó de la misma manera que en el ejemplo 1 durante dos semanas. La concentración inicial de glucosa se ajustó a 100 g/l. Como resultado, en la solución de cultivo extracelular, la micosporina-glicina-alanina se produjo como un nuevo MAA además de la sinorina y la porphyra-334. La cantidad de producción de micosporina-glicina-alanina obtenida fue de 25 mg/l. El análisis por HPLC se llevó a cabo en las condiciones que se muestran en la Tabla 5 y, como resultado, el tiempo de retención fue de alrededor de 15 minutos.

2-2. Identificación del nuevo MAA (micosporina-glicina-alanina)

El MAA nuevo se identificó de la siguiente manera. Usando un aparato de HPLC equipado con un detector de matriz de fotodiodos y un detector HR-MS, se midieron el espectro de absorción UV y la masa exacta. Las condiciones de medición de HPLC son las que se muestran en la siguiente tabla.

[Tabla 6]

Columna:	YMC-Pack Pro C18 RS-303 (5 µm, 4,6 mm ϕ x 25 cm) (fabricado por YMC)
Eluyente:	formiato de amonio 50 mM
Caudal:	0,5 ml/minuto
Tiempo de retención:	Sinorina: alrededor de 5 minutos Porphyra-334: alrededor de 7 minutos Micosporina-glicina-alanina: alrededor de 9 minutos

El espectro de absorción UV de un pico eluido alrededor de 9 minutos tuvo un máximo de absorción a alrededor de 333 nm y exhibió el mismo patrón que la sinorina y la porphyra-334. El pico se ionizó por ESI (voltaje fragmentador de 200,0 V) y la masa precisa se midió mediante un detector TOF. El valor de m/z ($[M + H]^+$) fue 317,1338 (valor calculado para $C_{13}H_{21}N_2O_7^+$: 317,1349).

(Ejemplo 3)

3. Producción de MAA usando *Corynebacterium*

Los presentes inventores produjeron MAA usando *Corynebacterium glutamicum.*

3-1. Introducción de genes de enzimas biosintéticas de MAA

3-1-1. Introducción de genes de enzimas biosintéticas de MAA en *Corynebacterium glutamicum*

Como genes de enzimas biosintéticas de MAA, se utilizaron los genes amir_4256 (SEQ ID NO: 1), amir_4257 (SEQ ID NO: 2), amir_4258 (SEQ ID NO: 3) y amir_4259 (SEQ ID NO: 4) derivados de *Actinosynnema mirum* DSM43827. Estos genes se ligaron a un vector que tiene un pBL1 ori, bajo el control de un promotor gapA (véase, Appl Microbiol Biotechnol (2008) 81: 291-301) para obtener un vector de expresión génica. *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 (NITE número de ingreso: NBRC 12168, depositado en el Depositario Internacional de Organismos de Patentes (IPOD), Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación (NITE), ubicado en 2-5-8, Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba) se transformó con el vector de expresión génica mediante electroporación para obtener una cepa productora de MAA. La electroporación se realizó de acuerdo con un método convencionalmente conocido.

3-2. Precultivo de *Corynebacterium glutamicum*

Se añadió una solución madre de glicerol de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 que tiene los genes de la enzima biosintética MAA y que se preparó en la Sección 3-1 anterior, a 50 ml de medio de cultivo BHI (ver Tabla 7). El *Corynebacterium glutamicum* se cultivó a 30 °C y se agitó a 180 rpm durante 24 horas.

[Tabla 7]

Medio BHI	
Caldo de infusión cerebro-corazón	37 g
Total	1000 ml

3-3. Cultivo principal de *Corynebacterium glutamicum*

La solución del precultivo (una cantidad correspondiente al 3%) se añadió a 50 ml de medio de cultivo BHI contenido en un matraz Sakaguchi. Al comienzo del cultivo, se añadieron 5 ml de gluconato de sodio 400 g/l al medio de cultivo BHI de forma adicional, de modo que la concentración inicial de gluconato de sodio paso a ser de 20 g/l. Para ajustar el pH, se añadieron 5 ml de solución de carbonato de calcio al 10%. La cepa se cultivó a 30 °C y se agitó a 180 rpm durante 48 horas.

3-4. Medición del MAA

Durante el cultivo principal, se tomó una muestra de 1 ml de la solución de cultivo en un tiempo predeterminado y se midió la turbidez de la solución de cultivo muestreada a 600 nm. La solución de cultivo muestreada se centrifugó a 15000 rpm durante 10 minutos para aislar la solución de cultivo extracelular y un precipitado (células microbianas). La solución de cultivo extracelular aislada se filtró usando un filtro de membrana que tenía un diámetro de poro de

0,2 µm y el filtrado se usó como una muestra de solución de cultivo extracelular. Las cantidades de producción de sinorina y porphyra-334 en la muestra de solución de cultivo extracelular se midieron por HPLC. Las condiciones de medición de HPLC son las mismas que se muestran en la Tabla 5.

3-5. Resultados

Los resultados se muestran en la Figura 2. Se verificó que tanto la sinorina como el porphyra-334 están presentes en la solución de cultivo extracelular.

(Ejemplo 4)

4. Producción de MAA usando una levadura

Los presentes inventores produjeron MAA utilizando *Saccharomyces cerevisiae.*

4-1. Introducción de genes de enzimas biosintéticas de MAA

4-1-1. Construcción de YPH499XW

Los casetes que expresan XYL1 por separado (xilosa reductasa derivada de *Scheffersomyces stipitis)* (SEQ ID NO: 13) XYL2 (xilitol deshidrogenasa derivada de *Scheffersomyces stipitis)* (SEQ ID NO: 14) y XKS1 (xiluloquinasa derivada de *Saccharomyces cerevisiae)* (SEQ ID NO: 15) codificando cada uno un gen de asimilación de xilosa, bajo el control del promotor TDH3, se digirieron con BssHII del plásmido pWX1X2XK (véase, Appl Environ Microbiol. 2004 Sep; 70 (9): 5407-14). Estos casetes se ligaron al vector pRS404 (número de ingreso ATCC: ATCC 87515) digerido con BssHII y que tiene un marcador de selección TRP1 para preparar un vector de integración genómica pIWX1X2XK. El vector de integración genómica pIWX1X2XK se trató con EcoRV. *Saccharomyces cerevisiae* YPH499 (Genetics 1989 May; 122 (1): 19-27) se transformó con los fragmentos obtenidos para obtener YPH499XW con capacidad de asimilación de xilosa. *Saccharomyces cerevisiae* se transformó de acuerdo con un método convencionalmente conocido.

4-1-2. Introducción de genes de enzimas biosintéticas de MAA en *Saccharomyces cerevisiae* YPH499XW

Los genes de enzimas biosintéticas de MAA, amir 4256 (SEQ ID NO: 1) y amir 4257 (SEQ ID NO: 2) se ligaron al vector pAT426 (FEMS Yeast Res. 2014 May; 14 (3): 399-411) que tiene un 2 µ *ori* y un marcador de selección URA3 de modo que estos genes se expresaron bajo el control del promotor TDH3 y el promotor ADH1 para preparar un vector de expresión génica pAT426-amir4256-7. Asimismo, Los genes de enzimas biosintéticas de MAA, amir4258 (SEQ ID NO: 3) y amir4259 (SEQ ID NO: 4) se ligaron al vector pAT425 (FEMS Yeast Res. 2014 May; 14 (3): 399-411) que tiene un 2 µ ori bajo el control del promotor TDH3 y el promotor ADH1 para obtener un vector de expresión génica pAT425-amir4258-9. YPH499XW se transformó con estos vectores de expresión génica pAT426-amir4256-7 y pAT425-amir4258-9 para obtener una cepa productora de MAA, es decir, YPH499XWMAA. *Saccharomyces cerevisiae* se transformó de acuerdo con un método convencionalmente conocido.

4-2. Precultivo de YPH499XWMAA

Una reserva de glicerol de YPH499XWMAA que tiene genes de enzimas biosintéticas de MAA, la cual se preparó en la sección 5-1 anterior, se cultivó en un medio de agar SD-LUW (véase, la Tabla 8 siguiente). Posteriormente, La colonia obtenida se inoculó en 5 ml de medio líquido SX-LUW (véase la Tabla 9 siguiente). La cepa se cultivó a 30 °C y se agitó a 150 rpm durante 13 días.

[Tabla 8]

Medio de agar SD-LUW	
Base de nitrógeno de levadura con/sin aminoácidos	6,7 g (0,67 %)
D-Glucosa	20 g (2 %)
Sulfato de adenina	40 mg (0,004 %)
L-histidina	20 mg (0,002 %)
L-lisina	30 mg (0,003 %)
Polvo de agar	20 g (2 %)
Total	1000 ml

[Tabla 9]

Medio líquido SX-LUW	
Base de nitrógeno de levadura con/sin aminoácidos	6,7 g (0,67 %)
D-Glucosa	20 g (2 %)
Sulfato de adenina	40 mg (0,004 %)
L-histidina	20 mg (0,002 %)
L-lisina	30 mg (0,003 %)
Total	1000 ml

4-3. Cultivo principal de YPH499XWMAA

La solución de precultivo (una cantidad correspondiente al 2%) se añadió a 100 ml de medio líquido SD-LU contenido en un matraz con deflector de 300 ml. La cepa se cultivó a 30 °C y se agitó a 150 rpm durante 48 horas.

4-4. Medición del MAA

Después de continuar el cultivo durante 13 días, se tomaron muestras de 4 ml de la solución de cultivo y se midió la turbidez de la solución de cultivo muestreada a 600 nm. La solución de cultivo muestreada se centrifugó a 3.000 rpm durante 5 minutos para aislar la solución de cultivo extracelular y un precipitado (células microbianas). La solución de cultivo extracelular aislada se pasó a través de un filtro de PTFE (0,45 pm) y la solución resultante se usó como una muestra de solución de cultivo extracelular.

4-5. Resultados

Se midió la concentración de MAA de la solución de cultivo extracelular. Como resultado, La sinorina se produjo de forma extracelular en una cantidad de 0,19 mg/l.

(Ejemplo 5)

5. Producción de MAA usando un laberintúlido

Los presentes inventores produjeron MAA usando un laberintúlido.

5-1. Introducción de genes de enzimas biosintéticas de MAA

5-1. Introducción de genes de enzimas biosintéticas de MAA en el laberintúlido

Para *Aurantiochytrium (Aurantiochytrium* sp.) SAM2179 (FERM BP-5601), los codones de los genes anteriores, amir_4256 (SEQ ID NO: 1), amir_4257 (SEQ ID NO: 2), amir_4258 (SEQ ID NO: 3) y amir_4259 (SEQ ID NO: 4) se modificaron (SEQ ID NO: 9 a 12, respectivamente). Estos genes así modificados se introdujeron en *Aurantiochytrium* SAM2179 por recombinación homóloga para obtener una cepa que produce MAA. La recombinación homóloga del laberintúlido se llevó a cabo de acuerdo con un método convencionalmente conocido.

5-2. Precultivo de *Aurantiochytrium*

Se añadió una solución madre de glicerol de *Aurantiochytrium* SAM2179 que tiene los genes de la enzima biosintética MAA y que se preparó en la Sección 5-1 anterior, a la placa de medio de agua de mar GY que contiene 1,5% de agar (véase, la Tabla 10 siguiente). *Aurantiochytrium* se cultivó a 28 °C durante 2 días.

[Tabla 10]

Placa de medio de agua de mar GY (pH 6,5)	
Glucosa	20 g (2 %)
Extracto de levadura	10 g (1 %)
Agua de mar artificial de Daigo	18 g

(continuación)

Placa de medio de agua de mar GY (pH 6,5)	
Agar	15 g
Total	1000 ml

5-3. Cultivo principal de *Aurantiochytrium*

El *Aurantiochytrium* pre-cultivado en la Sección 5-2 anterior se cultivó en 10 ml de medio de agua de mar GY (véase la Tabla 11 siguiente) a 28 °C y se agitó a 300 rpm durante 5 días.

[Tabla 11]

Medio de agua de mar GY (pH 6,5)	
Glucosa	20 g (2 %)
Extracto de levadura	10 g (1 %)
Agua de mar artificial de Daigo	18 g
Total	1000 ml

5-4. Medición del MAA

Tras la finalización el cultivo principal, la solución de cultivo se centrifugó a 15000 rpm durante 10 minutos para aislar la solución de cultivo extracelular y un precipitado (células microbianas). La solución de cultivo extracelular aislada se pasó a través de un filtro de membrana que tenía un diámetro de poro de 0,2 µm y la solución resultante se usó como una muestra de solución de cultivo extracelular. La cantidad de producción de sinorina en la muestra de solución de cultivo extracelular se midió por HPLC. Las condiciones de medición de HPLC son las mismas que se muestran en la Tabla 5.

5-5. Resultados

La sinorina se produjo de forma extracelular en una cantidad de 1,5 mg/l.

(Ejemplo 6)

6. Producción de MAA utilizando *Escherichia coli*

Los presentes inventores produjeron MAA usando *Escherichia coli.*

6-1. Introducción de genes de enzimas biosintéticas de MAA

6-1-1. Introducción de genes de enzimas biosintéticas de MAA en *Escherichia coli*

Como genes de enzimas biosintéticas de MAA, se utilizaron amir_4256 (SEQ ID NO: 1), amir_4257 (SEQ ID NO: 2), amir_4258 (SEQ ID NO: 3) y amir_4259 (SEQ ID NO: 4). Estos genes se ligaron a un vector pkk223-3 (GenBank No. M77749) que tiene un pBR322 *ori* bajo el control del promotor tac para preparar un vector de expresión génica. La *Escherichia coli* JM109 (código de producto: 9052, fabricado por Takara Bio Inc.) se transformó con este vector de expresión génica para obtener una cepa productora de MAA. *Escherichia coli* se transformó de acuerdo con un método convencionalmente conocido.

6-2. Precultivo de *Escherichia coli*

Se añadió una solución madre de glicerol de *Escherichia coli* JM109 que tiene los genes de la enzima biosintética MAA, y que se preparó en la Sección 6-1 anterior, a 5 ml de medio de cultivo LB (véase, la Tabla 12 siguiente). La *Escherichia coli* se cultivó a 37 °C y se agitó a 160 rpm durante 18 horas.

[Tabla 12]

Medio LB (pH 7,0)	
Cloruro de sodio	10 g (1 %)
Bactotriptona	10 g (1 %)
Extracto de levadura	5 g (0,5 %)
Total	1000 ml

6-3. Cultivo principal de *Escherichia coli*

La solución de precultivo (una cantidad correspondiente al 2%) se inoculó en 50 ml de medio de cultivo LB contenido en un matraz con deflector de 500 ml. El gluconato de sodio se agregó adicionalmente al medio de cultivo LB al comienzo del cultivo, de modo que la concentración inicial de gluconato de sodio pasó a ser de 50 g/l (una concentración final de 50 g/l), y el carbonato de calcio se agregó de manera tal que su concentración final paso a ser del 0,5%. La cepa se cultivó a 30 °C y se agitó a 160 rpm durante una semana.

6-4. Medición del MAA

Veinticuatro horas después del inicio del cultivo principal, se tomó una muestra de 1 ml de la solución de cultivo y se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos para aislar la solución de cultivo extracelular y un precipitado (células microbianas). La solución de cultivo extracelular aislada se usó como una muestra de solución de cultivo extracelular. La cantidad de producción de sinorina en la muestra de solución de cultivo extracelular se midió por HPLC. Las condiciones de medición de HPLC son las mismas que se muestran en la Tabla 5.

6-5. Resultados

Se midió la concentración de MAA en la solución de cultivo extracelular. Como resultado, La sinorina se produjo de forma extracelular en una cantidad de 0,82 mg/l.

Con respecto a lo anterior, se demostró que se puede producir un MAA usando un microorganismo y recuperarse de una solución de cultivo extracelular. Además, se demostró que puede obtenerse un MAA nuevo, es decir, micosporina-glicina-alanina. De acuerdo con el método de la presente invención, los MAA se pueden obtener a partir de una solución de cultivo extracelular. Esto es extremadamente ventajoso en relación con el proceso de purificación posterior.

Aplicabilidad industrial

De acuerdo con el método de la presente invención, se puede obtener un MAA estable en una gran cantidad mediante el uso de un microorganismo. El MAA obtenido de esta manera puede usarse como ingrediente activo de una composición que absorbe el UV. Por consiguiente, la presente invención se puede usar en los campos de, por ejemplo, cosméticos y productos farmacéuticos.

Texto libre del listado de secuencias

SEQ ID NO: 9: Amir_4256 de codones optimizados para SAM2179
SEQ ID NO: 10: Amir_4257 de codones optimizados para SAM2179
SEQ ID NO: 11: Amir_4258 de codones optimizados para SAM2179
SEQ ID NO: 12: Amir_4259 de codones optimizados para SAM2179

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> THE KITASATO INSTITUTE NAGASE & CO., LTD.

<120> Proceso para producir aminoácidos tipo micosporina utilizando microorganismos

<130> 672322

<150> JP 2014-099647
<151> 13/05/2014

<160> 15

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 1020
<212> ADN
<213> Actinosynnema mirum DSM 43827

<400> 1

gtgcttcgtg ttctgcacct gaccggttcg ccggtgagcc cgttcttcgc cgaactgtcc 60

actgtgtacg gtcggggctg cctgggcgcg gcggcggacc cggcgcgcta cgagttcctg 120

gtggcgcacg tgaccccgga cggccgctgg cgcttcccgg cggacctgac gccggaggcg 180

ctggcggctg cacccaggct ggggctgccc gaggcgctgg gcctgatcga atcccggtcg 240

gtggacgtgg ccgtgccgca gctgttctgc ccgcccggca tgaccacgta ccgcgcgctg 300

ctggacgccc tgggcgtgcc gtaccccgga aacccgccgg acgtgatggc gctgggcgcg 360

gacaaggcga tgacccgcgc ggtcgtggcg gcggcgggcg tccccgtccc ggagggccgc 420

gtggtcacct cggccgaccc ctgcccgctc ccgccgccgt tcgtggtgaa gcccgtggac 480

gccgacaact ccgacggcct gaccctggtg cacgaccgcg ccgactacca cgcggccctg 540

gacgcggcgt tcgcctgctc gccccgccgc agggccttgg tggagcgcta cgtgccaccg 600

ggccgcgagg tccgctgcgg cgtgctcgtc agatccggcg tcccgacgcc gctccccttg 660

gaggagtacc cgctcccgtc cggcgtccgc ccccgcgcgg acaagctggc cgacgacggg 720

ggcggctccc tgtccctggt ggccaaggcg gacggccgct cgtggatcgt cgaccacgac 780

gacccggtga cggcggccgt gcaggagcag gcgctgcgct gccacgaggc gctgggctgc 840

cgcgactaca gcctgttcga cttccggatc gacccggagg ggcggccgtg gttcctggag 900

gcggggttgt actgctcgtt cgcgccgacg agcgtgatca cgacgatggc gggcgcggcg 960

gggatcgggt tggcggagct gttcgccgag gccgtcacca ccgccgcgcg caggggggtga 1020

<210> 2
<211> 1290
<212> ADN
<213> Actinosynnema mirum DSM 43827

<400> 2

gtgtcccgga ccctgggcgc gctcgcgctg ctcctcgcgg ccctgccgtt cagcgccgcc 60

ctcaccgccg tggcggcgct gcgcgcggcg gtccggccat cgcccgcgcg ggcgacgccg 120

aggcggccga ggacggtgct gctgaccggc ggcaagatga ccaaggcgct gcacctggcg 180

cgcgcgttcc accgggccgg gcaccgggtc gtgctggtgg agacggcccg ctaccggctg 240

accgcgcacc ggttctcccg cgcggtcgac gcgttccacg tcgtgccgga ctcggccgac 300

ccccgctacc cgcaggcgct cctcgcgatc gtggagcggg agggcgtgga cgtgttcgtg 360

ccggtgtgca gcccggcgtc cagcgtccac gacgccgccg ccgcgccgct gctggcgacc 420

cggtgcgagg tgctgcacgc cgggctggag gtggtggagc tgctggacga caagcaccgc 480

ttcgccgagc tgtccgccga gctgggcctc ccggttcccc gctcgcaccg gatcaccgcg 540

ccggagcagg tgctcgacct ggggctggac gggccgcacg tgctcaagag catcccgtac 600

gacccggtga accggctgga cctgaccccg ctgccgaggc cgactcccga ggcgacgctg 660

gagttcctgc gcggcaagga cgtccgggac gggcacccgt gggtgctgca ggagttcgtg 720

gcgggcaagg agtactgcac gcacagcacc gtccggaacg gccgggtggt ggtctacggg 780

tgctgcgagt cctcggcgtt ccaggtgaac tacgagatgg tggacaagcc ggagatcgag 840

cgctgggtgc gggccttcgc cgaggccacc ggggtgaccg ggcaggtgtc gttcgacttc 900

atcgagtcgg cggacggccg cgcgctcgcc atcgagtgca acccgcgcac ccacagcgcc 960

atcaccatgt tccacgacca cccggacctg gcccgcgcct acctggaccc ggacgcgccg 1020

cagatccggc cgctgccgtc gagcaggccg acgtactggc tgttccacga gctgtggcgg 1080

gccctgtccg aaccggggac cgcgcgggag cggctgcggg tggtggcgcg cggcaaggag 1140

gcggtcttcg actggtccga cccgctgccg ttcctgctgc tgcaccacgt gcacgtgccg 1200

ctgctgctgc tgcgggcgct ggtgcgcggg caggactggg tgcgggtgga cttcaacatc 1260

ggcaagctgg tggcgccctc gggggactga 1290

<210> 3
<211> 855
<212> ADN
<213> Actinosynnema mirum DSM 43827

<400> 3

gtgaacccgt tgcccaccaa gggctccgcg tccggcgccg tgtccgcgcc gggcgcgccc 60

cgcccggtga cgccggtggc gctgctggcc gacaccctgg cccggttggc ggggcggtcg 120

gacctgccgc ccgacgtcgt cgccgagctg tccgccgccg ccgagctggc gtccggagtg 180

gacggttacg ccggtcggtg caccacgccg gagtcgcccg cgctgcgcga gctggccgcc 240

aggaccgccg agcacgactg gcggggacgg ggcggcgggg tcgcgctgga gcaggagatg 300

ctgtccgggc acgtcgaggg gcagctgctc aagaccctgc tgcgggcgct gcgggcgcgg 360

cgggtgctgg agatcggcat gttcaccggc tactcggcgc tcgccatggc cgaggagctg 420

ccggacgacg gggtcgtcgt cgcctgcgag ctggacccgg acgtggcggc cttcgcccgc 480

gagcggttct ccgcctcgcc gcacggccgg aaggtcgacg tgcgggtcgg gcccgcgctg 540

gacaccctgg cgggattggt gggcggcgag ccgttcgacc tggtgttcgt ggacgcggac 600

aaggccgggt acaccgagta cctcgcggtc gtgctggacg gcgggctgct cgcgccgcac 660

gggctggtgt gcgtggacaa cacgctgatg cagggcaaga cctacctgcc cggcgcccgt 720

gacgcggtgg gcgcggccgt ggaccggttc aaccggcacg tggcgcagcg gccggacgtg 780

gcgcaggtgc tcgtgccggt gcgcgacggg ctcaccctga tccgcagggt gacgcccgga 840

acgggggagc cgtga 855

<210> 4
<211> 1221
<212> ADN
<213> Actinosynnema mirum DSM 43827

<400> 4

atgacgacga acctcaccgc gacggtcacc gccacggaga acgacttccg ggtgcgcgcc 60

gtcgaggagc gcgactacct gctgacctac gtggacgggg cgttctcccc ggagagcagc 120

cggatcgccg accaccaccg cgcgcacggc cggtgcctga tgatcgtcga cgccaacgtc 180

caccgcctgc acggcgaccg catccgggcc tacttcgagc accacggcat cgcgctcacc 240

gcgctcccgc tggccatcga cgagacgcag aagtcgctgc gcacagtcga gcggatcgtg 300

gacgccttcg gcgagttcgg gctgatccgc aaggagcccg tgctcgtggt cggcggcggc 360

ctgctgaccg acgtggccgg gttcgcgtgc gcggtgttcc gccgctccac cgactacgtg 420

cgggtgccca cctcgctgat cgggctcatc gacgccagcg tcgcgatcaa ggtcgcggtg 480

aaccacggcc gcaccaagaa ccggctgggg gcgttccacg cgtccaagga ggtcgtgctc 540

gacttctcgt tcctggggac gctgccgacc gagcaggtcc gcaacggcat ggccgagctg 600

gtcaagatcg ccgtggtggc gaacgcggag gtgttccggc tgctggagaa gtacggcgag 660

gacctgctgc acaccgcgtt cggcacggtc gacggcaccc cgcagctgcg cgagaccgcc 720

cgcaaggtca cccacgaggc catcggcacc atgctggcgc tggaggcgcc gaacctgcgg 780

gagctggacc tggaccgggc gatcgcgttc ggccacacct ggagccccgc gctggagctg 840

gccccggaaa ccccctacct gcacgggcac gcgatcagcg tcgacatggc gctgtcctgc 900

acgatcgccg agcggcgcgg ctacctggcg accagcgagc gcgaccggat cttctggctg 960

ctgagcaagg tcggcctgtc gctggacagc ccgcacctga cgccggagct gctgcgcgcg 1020

gccaccgagt cgatcgtgca gacccgcgac gggctccagc gcgccgcgat gccccggccg 1080

atcgggacgt gctgcttcgt caacgacctc accgagtccg agctgctgga cgggctcgcc 1140

gcgcaccgcg agctggtcgc ccgctacccc aggggcggcg cgggcgagga cgtgcgggtc 1200

accaggagcg gtgccgcgtg a 1221

<210> 5
<211> 1041
<212> ADN
<213> Pseudonocardia sp. P1

<400> 5

tcaccggtgg tccgacgatg tctgcctgac ctcctgtcgg gcggcagaga tcagatcagc 60

gaacagctct cgtaccggtg ttgcggcggc gtgggccatc gtcgcgacga ccgaggagtg 120

ggcgaacgag cagtacaggc cggcctcgag gaagtagagg cggccgttcg ggtcgactcg 180

gaagtcgaag agcccatagt ggcggcatcc caacgcccgg taggcgcgcc gagcggcgtc 240

gtgaactgtc gcggtgagcg gatcggcggg atcgacgatc caggaccggt catccttggc 300

gaccaaacgc aggtcgccgg tggcagagcg gtcgagcttg tcgtcggcga gtcggatcgg 360

cttgtctgtc gggtccatgc ggtactcctc gaggggcagg cctacgaggt caccgccgcg 420

atcgatgatg ccgcaccgta cttcccggcc gagaggtacg aactgttcga ccagcgctcg 480

ctcactgtgg gcaagagcgt ctttgatcgc cacctcgatg gtctcgtcgg tctcggccaa 540

ggtcacgccg accgagttgt cggtgtcgac aggtttgatc acgagcggtg gccggagggt 600

gggggcttgt cctgcgcgga gtacctctcc ggccggaacc gcgacaccgg cgtgtgcgac 660

gacggcgcgg gcgcgggcct tgtccgctcc gagcgccatc acgtccgggg tgttgcccac 720

gtaggggatc ccttgcagat cgaacagcgc ccggtagtgg gtcatgccgg gtcggcagaa 780

catctggggc accatcacgt cgatcttgag acgtgcgatg tgggcgaggg cctcgggtag 840

cgacagcagc ggggcggcgg cgatgtcgcc gggcgccagg cctacgggga actgccaccc 900

acccggtgtc acgtaggcga tgtggacgtc gtagcgggtg gggtcggcgg tggcggtgag 960

gcagtctgcg gcgtagaggc gggacaggtc gcagaagaac tcgtcgaccg gcgatccggt 1020

caggtgcagc accgtgatca t 1041

<210> 6
<211> 1236
<212> ADN
<213> Pseudonocardia sp. P1

<400> 6

tcagtccccc gcggattcga cgagcttgcc gatgttgatg tcgatcttta cccagggcgt 60

gccacgtacc agcttgtcga gcagcagcgc ggcgatctgc aggtgaggga ccagcaggaa 120

cggcagcggg tcccgcgctt cgagcagtgc ttccttgccg cggaggatgg tgcgtaaccg 180

cttgggcagc gacgtcggag ccccgaggag ccggccgagc tcgtggtaga gccagtaggt 240

cgggcgggca cccgggtcgg ggaccgccgg tgggccggcg tgggccgaga ggtaggcgtc 300

agcgagacct gggtggtcgt ggaacagggt gatcgctgag tgggtacgtg gattgcactc 360

gatcgcgtac acgctgccgt cggcgcgttc gatgaagtcg aacgacagct gcccggtgac 420

gccgagttcg gtgcagaacc ggcggaccca ttcgtcgatg acggggtggg tgactgcggt 480

gtagttgagc tggaaggccg aggaggggca gcagcagtgc agtgccacgg cgccgtcgcg 540

gacggtggag tgtgtgcagt actcggtgcc ctccacgaac tcctgcagta tccaggggtt 600

gtccgacgag atcggtagcc ggcgtacgaa gtcggctgtc tggtgggcgg tcgggtgcgg 660

tagacgggtg aggtccatgc gtcggaccgg gtcgtaggcg atcgatttca ggacgtaggt 720

gcttccgggc gcggaggtga agtcgaagtc gatgacttgt tgcgggtcgg tgatcctgtg 780

ggtgtccggc accggcaggc ccatggctgc ggcggcctgg gcgaaacggt gtttgtcgtc 840

gagcagcgct acgacgtcgc tgtcagggtg cacgacctcg cagagtggct cgagcgcttg 900

cttggcgtcg gcgtcgtacc agctggcgag ggggctgcac accggaacgt agacgtcgac 960

gccctcgtgc tgggcgatct cggcgagtcg ttcggcgtag tcgggcgcgt cgggtgcagg 1020

gacgacgtgg aaggcgtcga cggctcggga gaagcggtgc ccggacagtc ggtagcgggc 1080

ctgctccacg agcacgaccc ggtgcccggc gtcatgaaac gcacgggcca gtgtgagcgc 1140

tttggtcatc ttcccgcccg acagcatgat cgtctgtcgg gtggctgtgc tgcgcgggcg 1200

gcgtgcccgc cgggtcagcc cgatcagcgc ggccat 1236

<210> 7
<211> 753
<212> ADN
<213> Pseudonocardia sp. P1

<400> 7

tcacgacgcc caccggatca gggtcagtcc gtctcggagc gggacgagga cctgttcgat 60

acgcggatca tcggtgacgg atctgttgaa cgccgcgatc gccgtgccgt tcggggtgga 120

ctcgcccgtc cagggctgcc cctgcatcaa ggtgttgtcg acacacatca ccccgtgcgg 180

ggcgagcagg ccgccttgca gcacggcgtc gaggtattcg gcgtatccgc ccttgtcggc 240

gtcgaggaag atcaggtcga agcgctgtcc gaccagtgtg gcgagggtgt cggtggccgc 300

gccgacttcg atcgtgatgc gctgggaggc cgtggaccgg gagagagctt cacgcgcgag 360

tgctgccgcg tgcgggtcga tctcgcaggc gatcaactca ccgtcctcgg gtagcgcttc 420

ggccatggcc agggccgagt agccggtgaa catcccgatc tcgagtaccc gtttggcctg 480

catggcctgg accaggaaac gcaggaagcg gccctcgacg tgtccggaga gcatctcttg 540

ctcgaggccg cttgcggtgt ggtcccagtt ctcggcgctg gtccggcgtt ccagttcccc 600

cagcgcgtgg gacgccggcg aggtgtgctc gtcgaggtag ggatccaggc cggaggcgag 660

gtcgcgggca cgaagcaggt ccggttcgac gtcgggcccg gcccgggcga ccaggtcgtc 720

gagcagaccg gccaggatcg tcgtcggcgt cac 753

<210> 8
<211> 1230
<212> ADN
<213> Pseudonocardia sp. P1

<400> 8

```
tcatgtcctg gcctcggtgt tcggggcggt cgtcaactct gtcttcgccg acgaccacat      60
ctcgacacct tctaccgatg tcggtaggcc agcgacgacg gccttgtgtg cggcaagggt     120
ttcgatcagt tccgtgtgct cgatgtcgtt ggcgaagtga cacgttccga tcgggcgggg     180
cagggcggcg cgtagcttcc ccgctcgtgt ctgcatgatc gatgcggtcg catcgatgag     240
cagctgctcg gtgaggtagg tgctgtcgac actgagtccg agtccgctga acagtcggtg     300
gatgcggtcg cgctccccgg tggtgatgtc gccgcggcgc gcggccaggg tcgccgagaa     360
cgccatgtcg atggcgatcg cgtgaccgtg caacatcggc gtgggtgggg cgagctccag     420
ggtcgggctc catgtgtggc cgaacgcgat gacgcgatcc aggtcgagtt cgtgcaggtt     480
gcggtgctcg agttcgagca tggtgtggat ggcgtcgtag gtgcaccggt gggcgatctg     540
gcgcagttcc ggggtgccct cgcggtgccc gaagcgtgtg gcgagcaggt cgtcgccgta     600
tttctccagc aggtcgaaca ggccggcgtt cgccacggtc gcaatcttga tcatctcggc     660
gacgccgttg cggacctgcg cttcgggcaa ggtggccagg aacgagaagt cgagcaggac     720
ctgttgcgag gcgtggaagg cgccgagacg attcttgtgt ctgccgtggt tgaccgcgac     780
cttcatcgcg acactcgcgt cgatgagacc gatcagcgtg gtggggatcc tgacgtaggg     840
cgtgccacgc ttgtagctgg cgcaggcgaa cccggtgacg tcggtggtca agcctccacc     900
gacgacgagc accggttcgg tgcgcagtag cccgaagtcg gcgtaggcgt cgacgatgcg     960
ctcgagagtg cgcaggctct tggccgtctc ggcgatggtc agtggtacga gggtcacggc    1020
gatgtcgtgg tggtcgaaat agctgcggat cgggtcgccg tagtgttcgt ggacggtctc    1080
gtcgatcacc atcaggcacc ggccccatgg ccgatagagg tcggcgagct cggtgttgtg    1140
gggcgcgaac acgccgtcga cgtaggagag cgtgaactcg atccgctccc aactctcgac    1200
acggaactcc gtatcggtcg cgctgagcac                                     1230
```

<210> 9
<211> 1020
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> amir_4256 de codones optimizados para SAM2179

<400> 9

atgctccgcg tgctccacct caccggtagc cctgtgagcc ccttctttgc cgagctcagc 60

accgtgtacg gccgcggctg cctcggtgcc gccgccgatc ctgcccgcta cgagtttctc 120

gtggcccacg tgacccccga cggtcgctgg cgcttccctg ccgatctcac ccctgaggcc 180

ctcgccgccg cccctcgcct cggcctcccc gaggccctcg gtctcattga gagccgcagc 240

gtggacgtgg ccgtgcccca gctcttctgc cctcccggta tgaccaccta ccgcgccctc 300

ctcgatgccc tcggcgtgcc ctaccctggt aaccctcccg acgtgatggc cctcggcgcc 360

gacaaggcca tgacccgcgc cgtggtggcc gccgccggtg tgcccgtgcc cgagggtcgc 420

gtggtgacca gcgccgatcc ctgccctctc cctcctccct ttgtggtgaa gcccgtggat 480

gccgacaaca gcgatggcct caccctcgtg cacgatcgcg ccgactacca cgccgccctc 540

gacgccgcct ttgcctgcag ccctcgccgc cgcgccctcg tggagcgcta cgtgcctccc 600

ggtcgcgagg tgcgctgcgg cgtgctcgtg cgcagcggtg tgcccacccc tctccctctc 660

gaggagtacc ctctccccag cggtgtgcgc ccccgcgccg acaagctcgc cgatgatggc 720

ggtggcagcc tcagcctcgt ggccaaggcc gacggtcgca gctggattgt ggaccacgat 780

gatcccgtga ccgccgccgt gcaggagcag gccctccgct gccacgaggc cctcggctgc 840

cgcgactaca gcctcttcga cttccgcatt gatcccgagg gtcgcccctg gtttctcgag 900

gccggcctct actgcagctt tgcccctacc agcgtgatca ccaccatggc cggtgccgcc 960

ggcatcggtc tcgccgagct cttcgccgag gccgtgacca ccgccgcccg ccgcggttga 1020

<210> 10
<211> 1290
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> amir_4257 de codones optimizados para SAM2179

<400> 10

atgagccgca ccctcggtgc cctcgccctc ctcctcgccg ccctcccttt cagcgccgcc 60

ctcaccgccg tggccgccct ccgcgccgcc gtgcgcccca gccccgcccg cgccaccct 120

cgccgccctc gcaccgtgct cctcaccggt ggcaagatga ccaaggccct ccacctcgcc 180

cgcgcctttc accgcgccgg ccaccgcgtg gtgctcgtgg agaccgcccg ctaccgcctc 240

accgcccacc gcttcagccg cgccgtggat gcctttcacg tggtgcccga cagcgccgat 300

cctcgctacc ctcaggccct cctcgccatt gtggagcgcg agggtgtgga tgtgttcgtg 360

cccgtgtgca gccccgccag cagcgtgcac gatgccgccg ccgcccctct cctcgccacc 420

cgctgcgagg tgctccacgc cggcctcgag gtggtggagc tcctcgacga taagcaccgc 480

tttgccgagc tcagcgccga gctcggtctc cccgtgcctc gcagccaccg catcaccgcc 540

cctgagcagg tgctcgatct cggcctcgac ggtccccacg tgctcaagag cattccctac 600

gatcccgtga accgcctcga cctcaccct ctccctcgcc ccacccctga ggccaccctc 660

gagttcctcc gcggcaagga tgtgcgcgac ggtcacccct gggtgctcca ggagttcgtg 720

gccggcaagg agtactgcac ccacagcacc gtgcgcaacg gtcgcgtggt ggtgtacggc 780

tgctgcgaga gcagcgcctt tcaggtgaac tacgagatgg tggataagcc cgagatcgag 840

cgctgggtgc gcgcctttgc cgaggccacc ggcgtgaccg gtcaggtgag cttcgacttt 900

attgagagcg ccgacggtcg cgccctcgcc atcgagtgca accctcgcac ccacagcgcc 960

attaccatgt tccacgatca ccccgacctc gcccgcgcct acctcgaccc cgatgccct 1020

cagattcgcc ctctccctag cagccgcccc acctactggc tctttcacga gctctggcgc 1080

gccctcagcg agcctggcac cgcccgcgag cgcctccgcg tggtggcccg cggtaaggag 1140

gccgtgttcg actggagcga tcccctcccc tttctcctcc tccaccacgt gcacgtgccc 1200

ctcctcctcc tccgcgccct cgtgcgcggt caggattggg tgcgcgtgga ctttaacatc 1260

ggcaagctcg tggcccctag cggcgactga 1290

<210> 11
<211> 855
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> amir_4258 de codones optimizados para SAM2179

<400> 11

atgaaccctc tccccaccaa gggtagcgcc agcggcgccg tgagcgcccc tggtgccccc 60

cgccccgtga cccctgtggc cctcctcgcc gataccctcg cccgcctcgc cggtcgcagc 120

gacctccctc ctgatgtggt ggccgagctc agcgccgccg ccgagctcgc cagcggcgtg 180

gacggctacg ccggtcgctg caccacccct gagagccccg ccctccgcga gctcgccgcc 240

cgcaccgccg agcacgattg gcgcggtcgc ggcggtggcg tggccctcga gcaggagatg 300

ctcagcggcc acgtggaggg tcagctcctc aagaccctcc tccgcgccct ccgcgcccgc 360

cgcgtgctcg agattggcat gttcaccggt tacagcgccc tcgccatggc cgaggagctc 420

cccgacgatg gtgtggtggt ggcctgcgag ctcgatcccg atgtggccgc ctttgcccgc 480

gagcgcttca gcgccagccc tcacggtcgc aaggtggacg tgcgcgtggg tcccgccctc 540

gacaccctcg ccggcctcgt gggtggcgag ccttttgatc tcgtgttcgt ggatgccgac 600

aaggccggct acaccgagta cctcgccgtg gtgctcgacg gcggtctcct cgcccctcac 660

ggcctcgtgt gcgtggacaa caccctcatg cagggcaaga cctacctccc cggtgcccgc 720

gatgccgtgg gtgccgccgt ggatcgcttt aaccgccacg tggcccagcg ccccgacgtg 780

gcccaggtgc tcgtgcccgt gcgcgacggc ctcaccctca tccgccgcgt gacccctggc 840

accggtgagc cctga 855

<210> 12
<211> 1221
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> amir_4259 de codones optimizados para SAM2179

<400> 12

atgaccacca acctcaccgc caccgtgacc gccaccgaga acgactttcg cgtgcgcgcc 60

gtggaggagc gcgattacct cctcacctac gtggacggtg ccttcagccc tgagagcagc 120

cgcattgccg atcaccaccg cgcccacggt cgctgcctca tgatcgtgga cgccaacgtg 180

caccgcctcc acggcgatcg cattcgcgcc tacttcgagc accacggcat cgccctcacc 240

gccctccctc tcgccatcga cgagacccag aagagcctcc gcaccgtgga gcgcatcgtg 300

gatgcctttg gcgagtttgg tctcattcgc aaggagcccg tgctcgtggt gggcggtggc 360

ctcctcaccg acgtggccgg tttcgcctgc gccgtgtttc gccgcagcac cgattacgtg 420

cgcgtgccca ccagcctcat tggcctcatt gatgccagcg tggccatcaa ggtggccgtg 480

aaccacggtc gcaccaagaa ccgcctcggt gcctttcacg ccagcaagga ggtggtgctc 540

gacttcagct ttctcggcac cctccccacc gagcaggtgc gcaacggcat ggccgagctc 600

gtgaagattg ccgtggtggc caacgccgag gtgttccgcc tcctcgagaa gtacggtgag 660

gatctcctcc acaccgcctt tggcaccgtg gatggtaccc ctcagctccg cgagaccgcc 720

cgcaaggtga cccacgaggc cattggcacc atgctcgccc tcgaggcccc taacctccgc 780

gagctcgacc tcgatcgcgc cattgccttc ggtcacacct ggagccccgc cctcgagctc 840

gcccctgaga ccccctacct ccacggccac gccatcagcg tggacatggc cctcagctgc 900

accattgccg agcgccgcgg ttacctcgcc accagcgagc gcgatcgcat cttttggctc 960

ctcagcaagg tgggcctcag cctcgacagc ccccacctca cccctgagct cctccgcgcc 1020

gccaccgaga gcatcgtgca gacccgcgat ggtctccagc gcgccgccat gcctcgcccc 1080

attggcacct gctgcttcgt gaacgacctc accgagagcg agctcctcga tggtctcgcc 1140

gcccaccgcg agctcgtggc ccgctaccct cgcggtggcg ccggcgagga cgtgcgcgtg 1200

acccgcagcg gtgccgcctg a 1221

<210> 13
<211> 957
<212> ADN
<213> Scheffersomyces stipitis

<400> 13

atgccttcta ttaagttgaa ctctggttac gacatgccag ccgtcggttt cggctgttgg 60

aaagtcgacg tcgacacctg ttctgaacag atctaccgtg ctatcaagac cggttacaga 120

ttgttcgacg gtgccgaaga ttacgccaac gaaaagttag ttggtgccgg tgtcaagaag 180

gccattgacg aaggtatcgt caagcgtgaa gacttgttcc ttacctccaa gttgtggaac 240

aactaccacc acccagacaa cgtcgaaaag gccttgaaca gaacccttтc tgacttgcaa 300

gttgactacg ttgacttgtt cttgatccac ttcccagtca ccttcaagtt cgttccatta 360

gaagaaaagt acccaccagg attctactgt ggtaagggtg acaacttcga ctacgaagat 420

gttccaattt tagagacctg gaaggctctt gaaaagttgg tcaaggccgg taagatcaga 480

tctatcggtg tttctaactt cccaggtgct ttgctcttgg acttgttgag aggtgctacc 540

atcaagccat ctgtcttgca agttgaacac cacccatact tgcaacaacc aagattgatc 600

gaattcgctc aatcccgtgg tattgctgtc accgcttact cttcgttcgg tcctcaatct 660

ttcgttgaat tgaaccaagg tagagctttg aacacttctc cattgttcga gaacgaaact 720

atcaaggcta tcgctgctaa gcacggtaag tctccagctc aagtcttgtt gagatggtct 780

tcccaaagag gcattgccat cattccaaag tccaacactg tcccaagatt gttggaaaac 840

aaggacgtca acagcttcga cttggacgaa caagatttcg ctgacattgc caagttggac 900

atcaacttga gattcaacga cccatgggac tgggacaaga ttcctatctt cgtctaa 957

<210> 14
<211> 1092
<212> ADN
<213> Scheffersomyces stipitis

<400> 14

atgactgcta acccttcctt ggtgttgaac aagatcgacg acatttcgtt cgaaacttac 60

gatgccccag aaatctctga acctaccgat gtcctcgtcc aggtcaagaa aaccggtatc 120

tgtggttccg acatccactt ctacgcccat ggtagaatcg gtaacttcgt tttgaccaag 180

ccaatggtct tgggtcacga atccgccggt actgttgtcc aggttggtaa gggtgtcacc 240

tctcttaagg ttggtgacaa cgtcgctatc gaaccaggta ttccatccag attctccgac 300

gaatacaaga gcggtcacta caacttgtgt cctcacatgg ccttcgccgc tactcctaac 360

tccaaggaag gcgaaccaaa cccaccaggt accttatgta agtacttcaa gtcgccagaa 420

gacttcttgg tcaagttgcc agaccacgtc agcttggaac tcggtgctct tgttgagcca 480

ttgtctgttg gtgtccacgc ctctaagttg ggttccgttg ctttcggcga ctacgttgcc 540

gtctttggtg ctggtcctgt tggtcttttg gctgctgctg tcgccaagac cttcggtgct 600

aagggtgtca tcgtcgttga cattttcgac aacaagttga agatggccaa ggacattggt 660

gctgctactc acaccttcaa ctccaagacc ggtggttctg aagaattgat caaggctttc 720

ggtggtaacg tgccaaacgt cgttttggaa tgtactggtg ctgaaccttg tatcaagttg 780

ggtgttgacg ccattgcccc aggtggtcgt ttcgttcaag tcggtaacgc tgctggtcca 840

gtcagcttcc caatcaccgt ttcgccatg aaggaattga ctttgttcgg ttctttcaga 900

tacggattca acgactacaa gactgctgtt ggaatctttg acactaacta ccaaaacggt 960

agagaaaatg ctccaattga ctttgaacaa ttgatcaccc acagatacaa gttcaaggac 1020

gctattgaag cctacgactt ggtcagagcc ggtaagggtg ctgtcaagtg tctcattgac 1080

ggccctgagt aa 1092

<210> 15
<211> 1803
<212> ADN
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 15

atgttgtgtt cagtaattca gagacagaca agagaggttt ccaacacaat gtctttagac 60

tcatactatc ttgggtttga tctttcgacc caacaactga aatgtctcgc cattaaccag 120

gacctaaaaa ttgtccattc agaaacagtg gaatttgaaa aggatcttcc gcattatcac 180

acaaagaagg gtgtctatat acacggcgac actatcgaat gtcccgtagc catgtggtta 240

gaggctctag atctggttct ctcgaaatat cgcgaggcta aatttccatt gaacaaagtt 300

atggccgtct cagggtcctg ccagcagcac gggtctgtct actggtcctc ccaagccgaa 360

tctctgttag agcaattgaa taagaaaccg gaaaaagatt tattgcacta cgtgagctct 420

gtagcatttg caaggcaaac cgcccccaat tggcaagacc acagtactgc aaagcaatgt 480

caagagtttg aagagtgcat aggtgggcct gaaaaaatgg ctcaattaac agggtccaga 540

gcccatttta gatttactgg tcctcaaatt ctgaaaattg cacaattaga accagaagct 600

tacgaaaaaa caaagaccat ttctttagtg tctaattttt tgacttctat cttagtgggc 660

catcttgttg aattagagga ggcagatgcc tgtggtatga acctttatga tatacgtgaa 720

agaaaattca gtgatgagct actacatcta attgatagtt cttctaagga taaaactatc 780

agacaaaaat taatgagagc acccatgaaa aatttgatag cgggtaccat ctgtaaatat 840

tttattgaga agtacggttt caatacaaac tgcaaggtct ctcccatgac tggggataat 900

ttagccacta tatgttcttt acccctgcgg aagaatgacg ttctcgtttc cctaggaaca 960

agtactacag ttcttctggt caccgataag tatcacccct ctccgaacta tcatcttttc 1020

attcatccaa ctctgccaaa ccattatatg ggtatgattt gttattgtaa tggttctttg 1080

gcaagggaga ggataagaga cgagttaaac aaagaacggg aaaataatta tgagaagact 1140

aacgattgga ctcttttttaa tcaagctgtg ctagatgact cagaaagtag tgaaaatgaa 1200

ttaggtgtat attttcctct gggggagatc gttcctagcg taaaagccat aaacaaaagg 1260

gttatcttca atccaaaaac gggtatgatt gaaagagagg tggccaagtt caaagacaag 1320

aggcacgatg ccaaaaatat tgtagaatca caggctttaa gttgcagggt aagaatatct 1380

cccctgcttt cggattcaaa cgcaagctca caacagagac tgaacgaaga tacaatcgtg 1440

aagtttgatt acgatgaatc tccgctgcgg gactacctaa ataaaaggcc agaaaggact 1500

ttttttgtag gtggggcttc taaaaacgat gctattgtga agaagtttgc tcaagtcatt 1560

ggtgctacaa agggtaattt taggctagaa acaccaaact catgtgccct tggtggttgt 1620

tataaggcca tgtggtcatt gttatatgac tctaataaaa ttgcagttcc ttttgataaa 1680

tttctgaatg acaattttcc atggcatgta atggaaagca tatccgatgt ggataatgaa 1740

aattgggatc gctataattc caagattgtc cccttaagcg aactggaaaa gactctcatc 1800

taa 1803

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un aminoácido tipo micosporina, que comprende las etapas de:

cultivar un microorganismo que produce el aminoácido tipo micosporina de forma extracelular,
aislar la solución de cultivo de células microbianas y la solución de cultivo extracelular, y
recuperar el aminoácido tipo micosporina de la solución de cultivo extracelular

en donde el microorganismo comprende genes de enzimas biosintéticas de aminoácidos tipo micosporina heterólogos, y los genes de enzimas biosintéticas de aminoácidos tipo micosporina están compuestos por amir_4256, amir_4257, amir_4258 y amir_4259 derivados de *Actinosynnema mirum* o compuestos de amir_4256 de codones optimizados (SEQ ID NO: 9), amir_4257 de codones optimizados (SEQ ID NO: 10), amir_4258 de codones optimizados (SEQ ID NO: 11) y amir_4259 de codones optimizados (SEQ ID NO: 12).

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además una etapa de purificación del aminoácido tipo micosporina recuperado.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el microorganismo es un microorganismo perteneciente a *Escherichia coli*, levaduras, actinomicetos, microalgas o laberintúlidos.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el microorganismo es un actinomiceto.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el actinomiceto pertenece al género *Streptomyces,* al género *Actinosynnema,* al género *Pseudonocardia* o al género *Corynebacterium.*

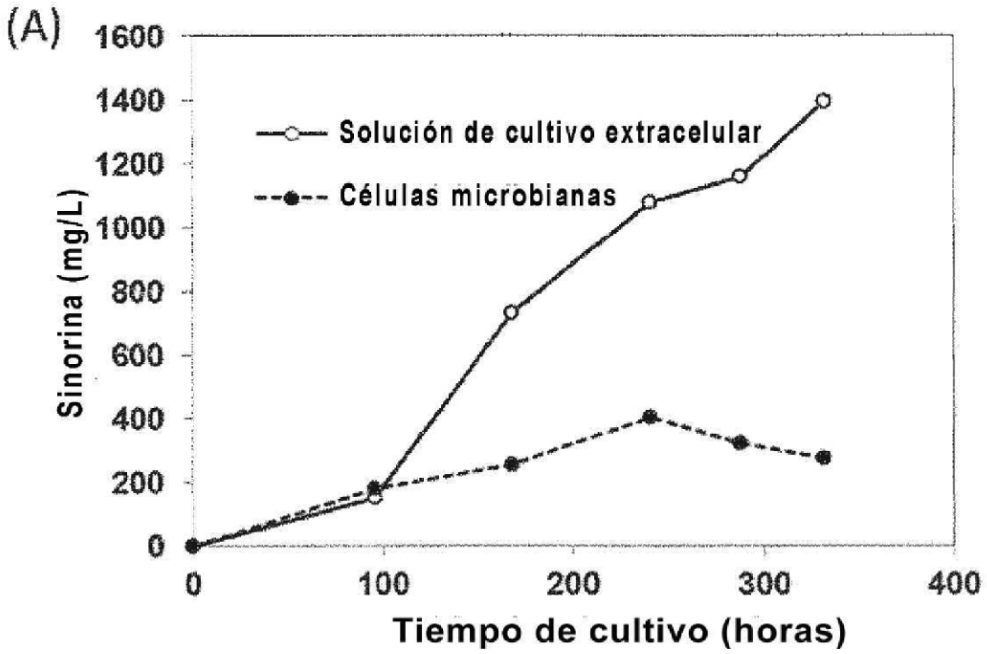
6. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el microorganismo es un laberintúlido y pertenece al género *Aurantiochytrium.*

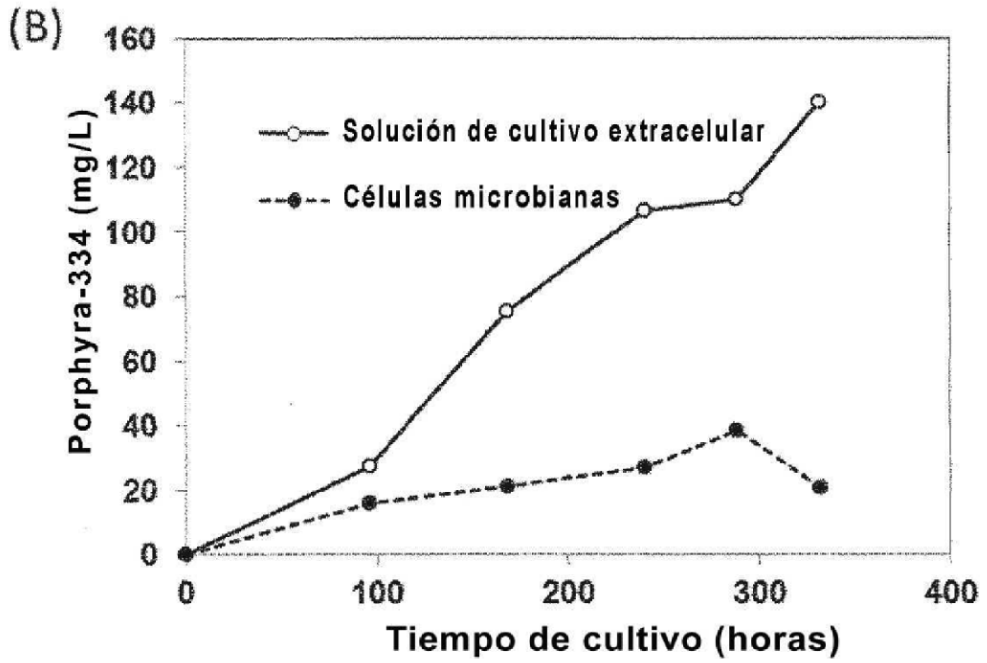
7. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el microorganismo es una levadura y pertenece al género *Saccharomyces.*

8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde un codón de al menos un gen de los genes de la enzima biosintética de aminoácidos tipo micosporina se modifica para un microorganismo en el que se va a introducir el gen.

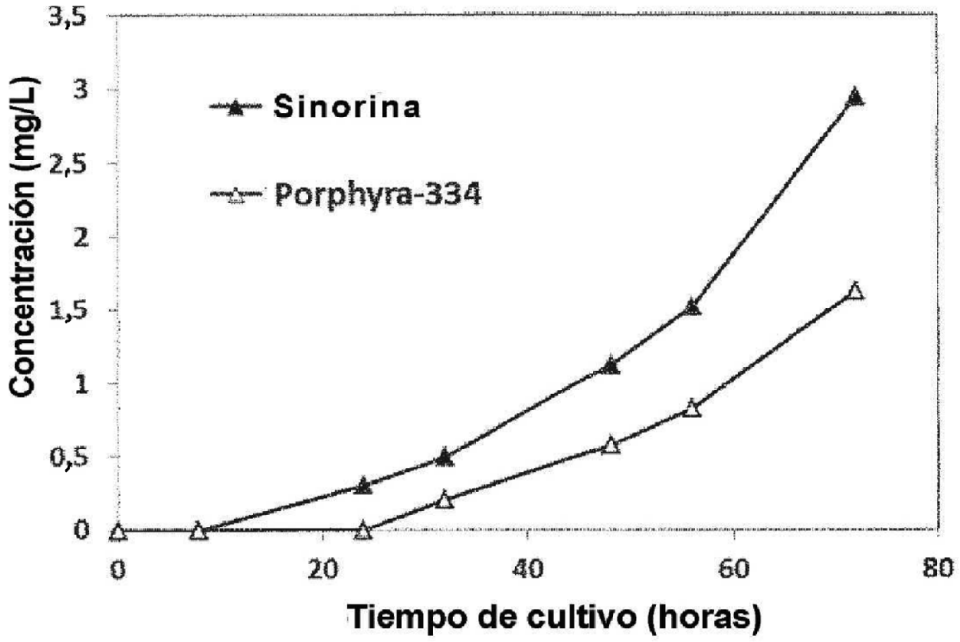
9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el microorganismo es *Streptomyces avermitilis* MA-4680 (número de ingreso NITE: NBRC 14893), *Streptomyces lividans* 1326 (NITE número de ingreso: NBRC 15675), *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 (NITE número de ingreso: NBRC 12168), *Aurantiochytrium* sp. SAM2179 (FERM BP-5601), *Escherichia coli* JM109 o *Saccharomyces cerevisiae* YPH499XW.

[Figura 1]


(A)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Sinorina (mg/L)
Solución de cultivo extracelular
Células microbianas
0
100
200
300
400
Tiempo de cultivo (horas)


(B)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Porphyra-334 (mg/L)
Solución de cultivo extracelular
Células microbianas
0
100
200
300
400
Tiempo de cultivo (horas)

[Figura 2]


3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
Concentración (mg/L)
Sinorina
Porphyra-334
0
20
40
60
80
Tiempo de cultivo (horas)