



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 286 504**

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

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **03798174 .3**

(86) Fecha de presentación : **23.09.2003**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1543144**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **22.06.2005**

(54) Título: **Producción de zeaxantina mediante *Phaffia*.**

(30) Prioridad: **27.09.2002 EP 02021599**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2007

(73) Titular/es: **DSM IP Assets B.V.**
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL

(72) Inventor/es: **Hoshino, Tatsuo;**
Ojima, Kazuyuki y
Setoguchi, Yutaka

(74) Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Producción de zeaxantina mediante *Phaffia*.

5 La presente invención se refiere a la producción de carotenoides xantófilos, especialmente zeaxantina y β -criptoxantina, mediante un microorganismo del género *Phaffia*.

La patente WO 94/06918 revela un método para transformar una cepa de *Phaffia*, que permite la clonación y expresión de genes heterólogos u homólogos clonados.

10 La patente US 5,744,341 revela secuencias de ADN y de aminoácidos para β -caroteno hidroxilasa.

Más concretamente, la presente invención proporciona un proceso para producir carotenoides xantófilos, especialmente zeaxantina y β -criptoxantina, mediante un microorganismo recombinante genéticamente modificado que pertenece al género *Phaffia*.

El empleo de los métodos de la presente invención permite producir otros carotenoides xantófilos útiles, aparte de la astaxantina, tales como zeaxantina y β -criptoxantina, como carotenoide xantófilo principal en el microorganismo recombinante del género *Phaffia*.

20 Cualquier cepa capaz de producir β -caroteno puede ser adecuada como cepa huésped. Si la cepa elegida como huésped es una cepa normal de *Phaffia* capaz de producir astaxantina a partir de β -caroteno, la producción de una mezcla de astaxantina y otros carotenoides xantófilos puede lograrse tras la introducción y expresión de un gen codificador de β -caroteno hidroxilasa. Por otro lado, cuando se elige como cepa huésped una cepa que no puede producir astaxantina y que acumula β -caroteno, es de esperar que se produzca el máximo nivel de carotenoides xantófilos tales como zeaxantina y β -criptoxantina, sin acumulación de astaxantina. Este tipo de cepa huésped acumuladora de β -caroteno puede obtenerse por mutagénesis de una cepa de *P. rhodozyma* acumuladora de astaxantina. Como alternativa la cepa huésped acumuladora de β -caroteno también se puede obtener desactivando astaxantina sintasa, un enzima que interviene en la biosíntesis de la astaxantina a partir de β -caroteno, revelado en la patente
30 US 6,365,386. La disgregación del gen de la astaxantina sintasa será una de las vías más útiles para desactivar el enzima.

Esta clase de cepa huésped acumuladora de β -caroteno se puede obtener igualmente de colecciones de cultivos de tipo público. P.ej., se puede adquirir *P. rhodozyma* ATCC96815 acumuladora de β -caroteno a la American Type Culture Collection (P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, USA). El aislamiento de una nueva cepa de *P. rhodozyma* acumuladora de β -caroteno procedente de la naturaleza, que puede ser un derivado o mutante espontáneo de una cepa productora de astaxantina - será otro procedimiento para preparar la cepa huésped de la presente invención.

Una faceta de la presente invención es un proceso para producir zeaxantina y β -criptoxantina, incluyendo el cultivo de una cepa recombinante de *Phaffia* que expresa β -caroteno hidroxilasa.

Dicha β -caroteno hidroxilasa cataliza la hidroxilación de β -caroteno en las posiciones 3 y 3' del anillo de β -ionona para producir el xantófilo zeaxantina vía β -criptoxantina. Los genes que codifican este enzima se han aislado de varias especies, p.ej. *crtZ* de especies de *Flavobacterium* (patente US 6,124,113), *crtZ* de *Erwinia uredovora*, *crtZ* de *Erwinia herbicola*, *crtZ* de bacterias marinas, *Agrobacterium aurantiacum* y especies de *Alcaligenes*, y *Paracoccus marcusii* (nº de acceso Y15112 al GenBank, 1997), y *Paracoccus carotinifaciens* sp. nov. Los genes de la β -caroteno hidroxilasa también se pueden obtener a partir de especies vegetales.

En la presente invención se puede usar un gen codificador de una proteína que tenga la actividad de la β -caroteno hidroxilasa.

Dicha β -caroteno hidroxilasa se puede obtener de las especies *Flavobacterium* R1534 WT (ATCC21588) (nº de acceso U62808 al GenBank), *E. uredovora* ATCC19321 (nº de acceso D90087 al GenBank), *E. herbicola* ATCC39368 (nº de acceso M87280 al GenBank), *Agrobacterium aurantiacum* (nº de acceso D58420 al GenBank), *Alcaligenes* PC-1 (nº de acceso D58422 al GenBank), *Paracoccus marcusii* MH1 (nº de acceso Y15112 al GenBank), o de la bacteria gram-negativa E396 (FERM BP-4283) (patente JP-A Hei 10-155497), que posee el gen la β -caroteno hidroxilasa.

Dicha β -caroteno hidroxilasa puede obtenerse, con mayor preferencia, de la *Flavobacterium* sp.R1534 WT (ATCC21588) (nº de acceso U62808 al GenBank), o también puede obtenerse como una secuencia de ADN sustancialmente homóloga a ella.

La expresión "secuencia de ADN esencialmente homóloga" respecto a la secuencia de ADN codificadora de la β -caroteno hidroxilasa se refiere a una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos con más del 60%, preferentemente más del 70%, con mayor preferencia más del 80% y, sobre todo, más del 90% de aminoácidos idénticos, en comparación con la secuencia aminoácida de *crtZ* de *Flavobacterium* sp.R1534 WT (ATCC21588), y es la secuencia aminoácida de un polipéptido que posee el mismo tipo de actividad enzimática que el enzima codificado por *Flavobacterium* sp.R1534 WT (ATCC21588).

El empleo del gen de β -caroteno hidroxilasa puede proporcionar a un microorganismo del género *Phaffia* la capacidad de producir zeaxantina y β -criptoxantina. El microorganismo recombinante de *Phaffia* que expresa un gen de la β -caroteno hidroxilasa puede prepararse mediante la consabida tecnología de recombinación.

5 Las técnicas usadas para aislar o clonar un ADN codificador de β -caroteno hidroxilasa de la presente invención son conocidas del estado técnico y comprenden el aislamiento a partir de ADN genómico. La clonación de la secuencia de ADN de la presente invención a partir de dicho ADN genómico puede efectuarse mediante la reacción en cadena de la polimerasa (en lo sucesivo designada como PCR).

10 El ADN, aislado o clonado, que codifica la β -caroteno hidroxilasa puede usarse preferentemente después de clonarlo en un vector de expresión adecuado para expresar el enzima en el microorganismo huésped *Phaffia*.

“Vector de expresión” incluye los vectores capaces de expresar secuencias de ADN contenidas en ellos, donde dichas secuencias se unen operativamente a otras secuencias - tales como las secuencias de control - capaces de llevar a cabo la expresión de dichas secuencias de ADN en un microorganismo perteneciente al género *Phaffia*. El término “unido operativamente” se refiere a una yuxtaposición cuyos componentes así descritos se hallan en una relación que les permite funcionar del modo deseado. El término “secuencia de control” está pensado para incluir, como mínimo, componentes necesarios para expresar el gen de interés, y también puede llevar otros componentes ventajosos. Las secuencias de control llevan generalmente promotores, terminadores y, en algunos casos, potenciadores, transactivadores o factores de transcripción. Los promotores constitutivos, tales como el promotor del gen de la gliceraldehído-3-deshidrogenasa (GAP) derivado de *P. rhodozyma* (patente WO 97/23,633), se pueden usar para obtener la expresión constitutiva. También se pueden emplear promotores inducibles, para lograr una expresión exactamente controlada. Uno de los ejemplos de promotores inducibles es el promotor de genes codificadores de proteínas de choque térmico o del gen de amilasa, y similares.

25 Para construir dichos vectores de expresión se pueden emplear métodos bien conocidos de los especialistas.

Se sobreentiende, aunque no se diga explícitamente, que los vectores de expresión deben ser replicables en los organismos huésped, ya sea como episomas o como parte integrante de un ADN cromosómico. En general cabe esperar mayor estabilidad del gen en el último caso. Para integrar el vector de expresión en el cromosoma del microorganismo huésped mediante una recombinación homóloga, se prepara un vector que contenga al menos una porción del fragmento de ADN cuya secuencia sea homóloga al ADN genómico del huésped. Para este propósito se puede emplear eficazmente un fragmento genético de ADN_r en un microorganismo del género *Phaffia*. El ADN_r es un tipo de ADN satélite que existe en multicopias sobre el genoma. Cuando se usa el fragmento de ADN_r como ADN accesible sobre el vector de expresión, el ADN objetivo que se expresa en dicho vector puede integrarse en el genoma huésped y también puede existir como multicopias. Esto puede dar al gen efectos dosificadores que contribuyan a la sobreexpresión de los enzimas objetivos. En los ejemplos de la presente invención se usó adecuadamente para tal fin un fragmento de ADN_r de este tipo. Se pretende que la presente invención incluya otras formas de vectores de expresión que desempeñen funciones equivalentes y que sean o lleguen a ser conocidas.

Una secuencia aislada de ADN codificadora de β -caroteno hidroxilasa puede manipularse de varias maneras para promover la expresión del polipéptido. La manipulación de la secuencia nucleótida codificadora de dicha β -caroteno hidroxilasa antes de su inserción en un vector de expresión puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas de modificación de secuencias nucleótidas mediante métodos de clonación son bien conocidas del estado técnico.

El ADN recombinante formado por dicho gen de β -caroteno hidroxilasa, que ha sido clonado en el vector de expresión, se introducirá en un microorganismo huésped. Los métodos para introducir ADN exógeno en células mi-
cóticas, incluyendo los microorganismos del género *Phaffia*, son bien conocidos de la especialidad e incluyen p.ej. la transformación por el método de LiCl, la fusión de protoplastos, la electroporación, los métodos de proyección de partículas (“particle-gun”), que comprenden el bombardeo con partículas recubiertas de ADNs, y otros métodos conocidos del estado técnico. En los ejemplos de la presente invención se aplicó el método de proyección de partículas para transformar *P. rhodozyma*.

55 El organismo recombinante obtenido de esta manera es capaz de sobreexpresar la secuencia de ADN que codifica la β -caroteno hidroxilasa. Por lo tanto, el organismo recombinante de la presente invención es útil para el proceso de producción de carotenoides xantófilos, especialmente zeaxantina y β -criptoxantina.

60 Otra faceta de la presente invención es un proceso biológico para producir zeaxantina y β -criptoxantina, que consiste en cultivar el microorganismo recombinante de *Phaffia* en presencia de sustrato, para producir carotenoides en un medio nutriente acuoso, en condiciones aeróbicas, y en aislar los carotenoides resultantes de las células de dicho microorganismo recombinante o del caldo cultivado.

65 Los carotenoides, incluyendo los xantófilos, se producen usualmente cultivando una cepa de *Phaffia* en un medio que contiene macro- y micronutrientes adecuados para las células, tales como melazas, sacarosa o glucosa como fuente de carbohidratos para el crecimiento celular y también como sustrato para producir carotenoides, y fuentes de nitrógeno tales como licor de maíz fermentado, extracto de levadura, sulfato diamónico, fosfato amónico, hidróxido

ES 2 286 504 T3

amónico o urea, fuentes de fósforo tales como fosfato amónico y ácido fosfórico, y micronutrientes añadidos o sales minerales tales como sulfato magnésico, sulfato de cinc y biotina o destiobiotina.

Las condiciones de cultivo son un margen de pH de 4 a 8 y un intervalo de temperatura de 15 a 26°C, durante 24 hasta 500 horas.

Las condiciones de cultivo preferidas son un margen de pH de 5 a 7 y un intervalo de temperatura de 18 a 22°C, durante 48 hasta 350 horas.

La aireación y la agitación durante el cultivo suelen dar resultados favorables para la producción de carotenoides.

Una vez producidos por cultivo de la cepa recombinante de *Phaffia* mediante los métodos de la presente invención, los carotenoides pueden aislarse del medio, en caso de haber sido secretados al mismo, o de las células del microorganismo, separándolos, si es necesario, de otros carotenoides que puedan estar presentes, mediante el empleo de métodos conocidos del estado técnico, si se desea un carotenoide específico.

Los carotenoides producidos conforme al método de la presente invención pueden usarse en un proceso para preparar comestibles o piensos. El especialista en la materia ya está familiarizado con tales procesos. Además, estos alimentos o piensos compuestos pueden llevar aditivos o componentes generalmente empleados para este propósito y conocidos del estado técnico.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la presente invención, pero sin limitar su alcance.

En los ejemplos se emplearon los siguientes materiales y métodos descritos a continuación:

Cepas

P. rhodozyma ATCC96594 (redepositada el 8 de abril de 1998 con el número de acceso ATCC 74438, conforme al tratado de Budapest)

P. rhodozyma ATCC96815 (redepositada el 18 de febrero de 1999 con el número de acceso ATCC 74486, conforme al tratado de Budapest)

E. coli TOP10: F⁻, *mrcA*, delta(*mrr-hsdRMS-mcrBC*), *phi80*, delta(*lacZ* M15), delta(*lacX74*), *recA1*, *deoR*, *araD139*, (*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL* (Str^r), *endA1*, *nupG* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA)

Vectores

pCR2.1-TOPO (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA)

pGEM-T (Promega Corporation, USA)

Métodos

Los enzimas de restricción y la T4 ADN ligasa se adquirieron a Takara Shuzo (Ohtsu, Japón).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó con el ciclador térmico de Perkin Elmer modelo 2400. Las condiciones respectivas de PCR están descritas en los ejemplos. Los cebadores de PCR se adquirieron a un suministrador comercial. Los cebadores de ADN fluorescente para secuenciar ADN se compraron a Pharmacia. El ADN se secuenció con el secuenciador automatizado de ADN fluorescente (ALFred, Pharmacia).

De EXTRASYN-TESE S.A. (Genay Cedex, Francia) y de WAKO (Osaka, Japón) se adquirió respectivamente una muestra auténtica de zeaxantina y β -caroteno. La β -criptoxantina se obtuvo de Roche Vitamins AG (Basle, Suiza).

Ejemplo 1

Clonación del gen de β -caroteno hidroxilasa (*crtZ*) a partir de ADN genómico del *Flavobacterium* sp. ATCC21588

Primero se preparó ADN genómico. Se inocularon células de *Flavobacterium* sp. R1534 WT (ATCC21588) (véase la patente US 6,124,113) en un medio de 50 ml que llevaba 1% de glucosa, 1% de triptona (Laboratorios Difco), 1% de extracto de levadura (Difco), 0,5% de MgSO₄ y 3% de NaCl, y se cultivó a 27°C en condiciones aeróbicas. Pasada la noche, el cultivo (50 ml) se centrifugó a 10.000 g durante 10 min. El gránulo se lavó un poco con 10 ml de tampón de lisis (EDTA 50 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,5), se resuspendió en 4 ml del mismo tampón suplementado con 10 mg de lisozima y se incubó a 37°C durante 15 min. Tras añadir 0,3 ml de N-lauroíl sarcosina (al 20%) se siguió incubando a 37°C 15 min. más, antes de extraer el ADN con fenol, fenol/cloroformo y cloroformo. El ADN se precipitó con etanol a la temperatura ambiente durante 20 minutos en presencia de acetato sódico 0,3 M (pH 5,2), seguido de una

centrifugación a 10.000 g durante 15 min. El gránulo se enjuagó con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en 1 ml de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). El ADN genómico así obtenido se dializó contra H₂O durante 48 horas, utilizando bolsas de celofán (de Sartorius, Alemania), se precipitó con etanol en presencia de acetato sódico 0,3 M y se resuspendió en H₂O. Mediante amplificación por PCR con un ciclador térmico (Perkin Elmer 2400, USA), usando como molde el ADN genómico preparado, se obtuvo una secuencia codificadora completa para el gen de β -caroteno hidroxilasa, sin excesiva región flanqueante. Como cebadores sintéticos se usaron: PZ1 (SEQ ID NO:1) (con un sitio *Sma* I CCCGGG) y PZ2 (SEQ ID NO:2) (con un sitio *Bam*H I GGATCC).

La PCR se realizó con un kit Advantage-HF PCR (CLONTECH Laboratories, Inc., USA). La mezcla de PCR se preparó según el manual del usuario detallado por el fabricante. La etapa inicial de desnaturalización del molde fue de 1 min. a 94°C. Se repitió 25 veces un ciclo de amplificación de 30 segundos a 94°C y 4 min. a 68°C. Tras otros 3 min. de reacción a 68°C, la mezcla reactiva se mantuvo a 15°C. Durante esta reacción se amplificó un fragmento de ADN que contenía un ORF completo del gen de β -caroteno hidroxilasa (522 bp). Este gen amplificado de β -caroteno hidroxilasa se ligó con un vector pCR2.1-TOPO y se introdujo en células de *E. coli* TOP 10 mediante un kit de clonación TOPO TA (Invitrogen Corporation, USA), según un manual de instrucciones preparado por el fabricante. Para el análisis secuencial se eligieron varios clones. Se examinó la secuencia del gen clonado de β -caroteno hidroxilasa para cada clon candidato. Uno de los clones de ADN que presentaba totalmente la misma secuencia que la secuencia de β -caroteno hidroxilasa del *Flavobacterium* sp. ATCC21588 (nº de acceso U62808 al GenBank) se designó como pTOPO-PZ#23N. Un fragmento *Sma* I/*Bam*H I de 522 bp, recortado del pTOPO-PZ#23N, se usó como casete genético crtZ del *Flavobacterium* sp.

Ejemplo 2

Clonación del gen de β -caroteno hidroxilasa (*crtZ*) a partir de ADN genómico de *E. herbicola* ATCC39368

Se inocularon células de *E. herbicola* (*Escherichia vulneris*) (ATCC39368) en un medio de 10 ml que llevaba 1% de triptona (Laboratorios Difco), 0,5% de extracto de levadura (Difco), 0,5% de NaCl, y se cultivó a 26°C bajo condiciones aeróbicas. Pasada la noche, el cultivo (10 ml) se centrifugó a 10.000 g durante 10 min. El gránulo se empleó para preparar ADN genómico mediante un kit de cultivo sanguíneo y celular QIAGEN DNA Midi (QIAGEN, Alemania) según un protocolo preparado por el fabricante. Mediante amplificación por PCR con un ciclador térmico (Perkin Elmer 2400, USA), usando como molde el ADN genómico preparado, se obtuvo una secuencia codificadora completa del gen de β -caroteno hidroxilasa, sin excesiva región flanqueante. Se usaron dos cebadores sintéticos: EZ1 (SEQ ID NO:3) (con un sitio *Sma* I CCCGGG) y EZ2 (SEQ ID NO:4) (con un sitio *Sal* I GTCGAC).

La PCR se realizó con un kit Advantage-HF PCR (CLONTECH Laboratories, Inc., USA). La mezcla de PCR se preparó según el manual del usuario detallado por el fabricante. La etapa inicial de desnaturalización del molde fue de 1 min. a 94°C. Se repitió 25 veces un ciclo de amplificación de 30 segundos a 94°C y 4 min. a 68°C. Tras otros 3 min. de reacción a 68°C, la mezcla reactiva se mantuvo a 15°C. Durante esta reacción se amplificó un fragmento de ADN que contenía un ORF completo del gen de β -caroteno hidroxilasa (543 bp). Este gen amplificado de β -caroteno hidroxilasa se ligó con un vector pCR2.1-TOPO y se introdujo en células de *E. coli* TOP 10 mediante un kit de clonación TOPO TA (Invitrogen Corporation, USA), según un manual de instrucciones preparado por el fabricante. Para el análisis secuencial se eligieron varios clones. Se examinó la secuencia del gen clonado de β -caroteno hidroxilasa para cada clon candidato. Uno de los clones de ADN que presentaba totalmente la misma secuencia que la secuencia de β -caroteno hidroxilasa de *E. herbicola* ATCC39368 (nº de acceso M87280 al GenBank) se denominó pTOPO-EZ#2. Un fragmento *Sma* I/*Sal* I de 543 bp, recortado del pTOPO-EZ#2, se usó como casete genético crtZ del *E. herbicola*.

Ejemplo 3

Preparación de los componentes del vector de expresión

Se prepararon los componentes del vector de expresión: un gen resistente a G418, el promotor y la región terminadora del gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (designado en lo sucesivo como GAP) de *P. rhodozyma*, y un fragmento de ADN_r de *P. rhodozyma*.

Se preparó un casete genético resistente al G418 de la manera siguiente. Se ligó un conector *Sac* I al sitio único *Hind* III del vector, pUC-G418 (ver patente US nº 6,365,386), que acoge el casete genético resistente al G418, y el vector resultante se designó como pG418Sa512. Como casete genético resistente al G418 se utilizó un fragmento *Kpn* I/*Sac* I de 1,7 kb, recortado del pG418Sa512.

Tanto el promotor y el terminador del gen GAP como el fragmento de ADN_r se obtuvieron por PCR, empleando como molde el ADN genómico de *P. rhodozyma* ATCC 96594. Para obtener el ADN genómico se utilizó un kit de cultivo sanguíneo y celular QIAGEN DNA Midi (QIAGEN, Alemania) con las células de *P. rhodozyma* ATCC 96594 cultivadas durante la noche en medio YPD (Laboratorios Difco).

ES 2 286 504 T3

La PCR se llevó a cabo con un kit de PCR Advantage-HF (de CLONTECH Laboratories, Inc., USA) y un ciclador térmico (Perkin Elmer 2400, USA), usando como molde el ADN genómico preparado.

Los dos cebadores sintéticos empleados para amplificar la secuencia del promotor del GAP fueron GAP#1 (SEQ ID NO:5) (con un sitio *Not* I GCGGCCGC) y GAP#5 (SEQ ID NO:6) (con un sitio *Sma* I CCCGGGG).

La etapa inicial de desnaturalización del molde fue de 5 min. a 94°C. Se repitió 25 veces un ciclo de amplificación de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 1 min. a 72°C. Tras otros 10 min. de reacción a 72°C, la mezcla reactiva se mantuvo a 4°C. Durante esta reacción se amplificó un fragmento de ADN que contenía el promotor de GAP (398 bp). Este promotor de GAP amplificado se ligó con un vector pCR2.1-TOPO y se introdujo en células de *E. coli* TOP 10 mediante un kit de clonación TOPO TA (Invitrogen Corporation, USA). Para el análisis secuencial se eligieron varios clones. Se examinó la secuencia del promotor del GAP clonado de cada clon candidato. Uno de los clones de ADN que presentaba completamente la misma secuencia que el promotor de GAP de *P. rhodozyma* (nº de acceso Y08366 al GenBank) se denominó pTOPO-pGAP2#1. Un fragmento *Not* I/*Sma* I de 398 bp, recortado del pTOPO-pGAP2#1, se usó como casete promotor del GAP.

Los cebadores sintéticos usados para amplificar la secuencia terminadora del GAP fueron GAP#33 (SEQ ID NO:7) (con un sitio *Bam*H I-*Sal* I GGATCCGTCGAC) y GAP#4 (SEQ ID NO:8) (con un sitio *Kpn* I GGTACC).

Las condiciones de la PCR fueron iguales a las descritas arriba para el promotor del GAP. Durante esta reacción se amplificó un fragmento de ADN que contenía el terminador del GAP (302 bp). Este terminador del GAP amplificado se ligó con un vector pCR2.1-TOPO y se introdujo en células de *E. coli* TOP 10 mediante un kit de clonación TOPO TA. Para el análisis secuencial se eligieron varios clones. Se examinó la secuencia del terminador del GAP clonado para cada clon candidato. Uno de los clones de ADN que presentaba completamente la misma secuencia que el terminador de GAP de *P. rhodozyma* (nº de acceso Y08366 al GenBank) se denominó pTOPO-tGAP#1. Un fragmento *Bam*H I/*Kpn* I de 302 bp o un fragmento *Sal* I/*Kpn* I de 296 bp, recortado del pTOPO-tGAP#1, se utilizó como casete terminador del GAP.

Los dos cebadores sintéticos empleados para amplificar el fragmento de ADN_r fueron R#1 (SEQ ID NO:9) (con un sitio *Sal* I GAGCTC) y R#2 (SEQ ID NO:10) (con un sitio *Not* I-*Sac* I GCGGCCGCGAGCTC).

Las condiciones de la PCR fueron iguales a las descritas arriba para el promotor del GAP. Durante esta reacción se amplificó un fragmento de ADN que contenía el ADN_r (3126 bp). Este ADN_r se ligó con un vector pCR2.1-TOPO y se introdujo en células de *E. coli* TOP 10 mediante un kit de clonación TOPO TA. Para el análisis secuencial se eligieron varios clones. Se examinó la secuencia del ADN_r clonado para cada clon candidato. Uno de los clones de ADN que presentaba completamente la misma secuencia que el ADN_r de *P. rhodozyma* (nº de acceso D31656, AF139632 al GenBank) se designó como pTOPO-rDNA#1. Un fragmento *Sac* II/*Not* I de 1960 bp, recortado del pTOPO-rDNA#1, se utilizó como casete del ADN_r.

Ejemplo 4

Composición del vector de expresión portador del gen de la β -caroteno hidroxilasa (*crtZ*) obtenido a partir de *Flavobacterium* sp. o de *E. herbicola*

Para construir el vector de expresión portador del *crtZ* de *Flavobacterium* sp. se alinearon mediante ligación por este orden: el casete de ADN_r y el casete promotor del GAP (obtenidos en el ejemplo 3), el casete genético *crtZ* del *Flavobacterium* sp. (obtenido en el ejemplo 1), y el fragmento *Bam*H I/*Kpn* I del casete terminador del GAP y el casete genético resistente al G418 (obtenidos en el ejemplo 3), utilizando un pGEM-T como esqueleto. El vector de expresión resultante se designó como pRPZG-ptGAP2.

Para construir el vector de expresión portador del *crtZ* de *E. herbicola* se alinearon mediante ligación en este orden: el casete de ADN_r y el casete promotor del GAP (obtenidos en el ejemplo 3), el casete genético *crtZ* de *E. herbicola* (obtenido en el ejemplo 2) y el fragmento *Sal* I/*Kpn* I del casete terminador del GAP y el casete genético resistente al G418 (obtenidos en el ejemplo 3), usando un pGEM-T como esqueleto. El vector de expresión resultante se denominó pREZG-ptGAP2.

Ejemplo 5

Introducción en *P. rhodozyma* del vector de expresión portador del gen de la β -caroteno hidroxilasa (*crtZ*) de *Flavobacterium* sp. o de *E. herbicola*

Cada uno de los vectores de expresión obtenidos en el ejemplo 4, pRPZG-ptGAP2 y pREZG-ptGAP2, portadores respectivamente del gen *crtZ* de *Flavobacterium* sp. y de *E. herbicola*, se introdujo en el *P. rhodozyma* ATCC 96815, una cepa mutante productora de β -caroteno, aplicando sobre todo el método de proyección de partículas descrito en la patente EP 1.158.051. Para la selección directa de las cepas recombinantes se usó un medio YPD-agar que contenía D-sorbitol y D-manitol 0,75 M y 0,1 mg/ml de genética.

ES 2 286 504 T3

Como resultado, de cada pRPZG-ptGAP2 y pREZG-ptGAP2 se obtuvieron cientos de transformantes resistentes a 0,1 mg/ml de genética, y se eligieron al azar 35 transformantes de cada procedencia para su posterior caracterización.

Ejemplo 6

*Caracterización de las cepas recombinantes de *P. rhodozyma* con crtZ*

Las cepas recombinantes de *P. rhodozyma* ATCC 96815 con *crtZ* así obtenidas se cultivaron en un matraz Erlenmeyer de 500 ml con 50 ml de medio productivo, agitando a 20°C durante 7 días, después de inocular un cultivo de siembra preparado en un tubo de ensayo (de 21 mm de diámetro) con 7 ml de medio de siembra y agitado a 20°C durante 3 días. Se extrajo un volumen adecuado de caldo de cultivo, para analizar el crecimiento celular y la productividad de carotenoides. Los medios tenían la siguiente composición:

Medio de siembra: glucosa 30,0 g/l, NH_4Cl 4,83 g/l, KH_2PO_4 1,0 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,88 g/l, Na Cl 0,06 g/l, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/l, KH-ftalato 20,0 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 28 g/l, solución de oligoelementos 0,3 ml, solución vitamínica patrón 1,5 ml, (el pH se ajustó a 5,4-5,6).

Solución de oligoelementos: H_2SO_4 4 N 100 ml/l, ácido cítrico- H_2O 50,0 g/l, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 16,7 g/l, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2,5 g/l, $\text{MnSO}_4 \cdot 4,5\text{H}_2\text{O}$ 2,0 g/l, H_3BO_3 2,0 g/l, Na_2MoO_4 2,0 g/l, KI 0,5 g/l.

Solución vitamínica patrón para el medio de siembra: H_2SO_4 4 N 17,5 g/l, mio-inositol 40,0 g/l, ácido nicotínico 2,0 g/l, Ca-D-pantotenato 2,0 g/l, vitamina B_1 (tiamina HCl) 2,0 g/l, ácido p-aminobenzoico 1,2 g/l, vitamina B_6 (piridoxina HCl) 0,2 g/l, solución patrón de biotina 8,0 ml.

La solución patrón de biotina se preparó añadiendo H_2SO_4 4 N a 50 ml de etanol hasta un total de 100 ml. Luego se agregaron 400 mg de D-biotina.

Medio productivo: glucosa 22,0 g/l, KH_2PO_4 14,25 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,1 g/l, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,865 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,7 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,28 g/l, solución de oligoelementos 4,2 ml, solución vitamínica patrón 9,35 ml, (el pH se ajustó a 5,5).

Solución vitamínica patrón para el medio productivo: H_2SO_4 4 N 17,5 g/l, ácido nicotínico 2,0 g/l, Ca-D-pantotenato 3,0 g/l, vitamina B_1 (tiamina HCl) 2,0 g/l, ácido p-aminobenzoico 1,2 g/l, vitamina B_6 (piridoxina HCl) 0,2 g/l, solución patrón de biotina 30,0 ml.

Una porción de caldo del cultivo de siembra (2,5 ml) se transfirió a 47,5 ml del medio productivo en un matraz Erlenmeyer de 500 ml. Luego se inició el cultivo a 20°C con agitación rotatoria a 200 rpm. Al segundo día de fermentación se añadieron al medio 5 ml de solución de glucosa al 50% y luego se prosiguió la fermentación. Al cuarto día de fermentación se extrajeron 2 ml de caldo cultivado, se añadieron de nuevo 5 ml de solución de glucosa al 50% al medio y luego se siguió cultivando durante 3 días más. Al séptimo día se extrajo una parte alícuota del cultivo y se usó para analizar la producción de los carotenoides y el crecimiento celular.

Para analizar el crecimiento celular se midió la densidad óptica a 660 nm con un fotómetro UV-1200 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japón).

Para analizar el contenido de β -caroteno, de β -criptoxantina y de zeaxantina el caldo extraído se mezcló con una combinación de disolventes (alcohol etílico, hexano y acetato de etilo) y los carotenoides se extrajeron del caldo y de las células de *P. rhodozyma*, agitando vigorosamente con perlas de vidrio. Después de la extracción, las células disgregadas y las perlas se separaron por centrifugación y el sobrenadante obtenido se analizó por HPLC, para determinar el contenido de carotenoides. Las condiciones de HPLC fueron las siguientes: columna de HPLC: Chrompack Lichrosorb si-60 (4,6 mm, 250 mm); temperatura: temperatura ambiente; eluyente: acetona/hexano (18/82) con 1 ml de agua/l de eluyente; volumen inyectado: 10 μl , caudal: 2,0 ml/minuto; detección: por UV a 450 nm.

Como resultado, se encontró que todas las cepas recombinantes (35 transformantes por cada tipo de vector de expresión, pRPZG-ptGAP2 y pREZG-ptGAP2, del gen *crtZ*) produjeron zeaxantina y β -criptoxantina sin acumular astaxantina.

En la tabla se muestra el perfil de fermentación de 3 cepas recombinantes representativas, seleccionadas entre los transformantes que expresan el gen *crtZ* de *Flavobacterium* sp. o de *E. herbicola*, respectivamente, junto con su cepa huésped (*P. rhodozyma* ATCC 96815).

ES 2 286 504 T3

TABLA

Carotenogénesis y perfil de crecimiento de las cepas recombinantes cultivadas en matraz agitado

Cepa	Origen del crtZ	CARO (mg/l)	CRIPTO (mg/l)	ZEA (mg/l)	ASTA (mg/l)	DO a 660 nm
PZ-7	<i>Flavobacterium</i> sp.	4,7	3,5	5,7	0,0	46,3
PZ-24	<i>Flavobacterium</i> sp.	7,1	2,7	2,7	0,0	48,3
PZ-25	<i>Flavobacterium</i> sp.	6,3	2,1	2,7	0,0	48,3
EZ-7	<i>E. herbicola</i>	3,3	2,7	2,2	0,0	49,0
EZ-13	<i>E. herbicola</i>	3,3	2,8	2,3	0,0	44,7
EZ-14	<i>E. herbicola</i>	3,6	3,1	2,4	0,0	45,9
ATCC 96815	-	10,2	0,0	0,0	0,0	51,9

CARO: β -caroteno; CRIPTO: β -criptoxantina; ZEA: zeaxantina;

ASTA: astaxantina

Tal como muestra la tabla, la conversión del β -caroteno a β -criptoxantina y a zeaxantina se ejemplificó en todas las cepas de *Phaffia* recombinantes que expresan el gen crtZ de *Flavobacterium* sp. o el gen crtZ de *E. herbicola*.

REIVINDICACIONES

1. Proceso para producir zeaxantina y β -criptoxantina, que comprende el cultivo de un microorganismo recombinante del género *Xanthophyllomyces* (*Phaffia*) - el cual expresa un gen de β -caroteno hidroxilasa - en condiciones aeróbicas, en un medio nutriente acuoso, y la separación de los carotenoides resultantes, de las células de dicho microorganismo recombinante o del caldo cultivado, de modo que el gen de β -caroteno hidroxilasa proviene de un microorganismo escogido del grupo formado por *Flavobacterium* sp. R1534 WT (ATCC21588), *Erwinia uredovora* ATCC19321, *Erwinia herbicola*, ATCC39368, *Agrobacterium aurantiacum*, *Alcaligenes* PC-1, *Paracoccus marcusii* MH1 y bacterias gram-negativas E-396 (FERM BP-4283) que poseen el gen de β -caroteno hidroxilasa, y el cultivo se efectúa en un margen de pH de 4 a 8 y en un intervalo de temperatura de 15 hasta 26°C durante 24 hasta 500 horas.

2. El proceso según la reivindicación 1, en que el microorganismo recombinante proviene del *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) ATCC96815.

3. El proceso según la reivindicación 1 o 2, en que el gen de la β -caroteno hidroxilasa proviene del *Flavobacterium* sp. R1534 WT (ATCC21588) o bien la secuencia de ADN del gen de la β -caroteno hidroxilasa es sustancialmente homóloga a ella, de manera que su secuencia aminoácida presenta más del 90% de aminoácidos idénticos comparada con la secuencia aminoácida del crtZ del *Flavobacterium* sp. R1534 WT.

4. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en que el gen de β -caroteno hidroxilasa es expresado en el microorganismo recombinante, empleando las secuencias de control capaces de efectuar la expresión de secuencias de ADN en un microorganismo del género *Phaffia*.

5. El proceso según la reivindicación 1, en que el cultivo se efectúa en un margen de pH de 5 a 7 y en un intervalo de temperatura de 18 hasta 22°C durante 48 hasta 350 horas.

ES 2 286 504 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Roche vitamins AG	
5	<120> Production of zeaxanthin by <i>Phaffia</i>	
	<130> NDR5225	
10	<160> 10	
	<170> PatentIn version 3.1	
15	<210> 1	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
20	<400> 1	
	cccgggatga gcacttgggc cgcaat	26
25	<210> 2	
	<211> 26	
	<212> DNA	
30	<213> Artificial	
	<400> 2	
35	ggatcctcat gtattgcgat ccgccc	26
	<210> 3	
	<211> 26	
40	<212> DNA	
	<213> Artificial	
45	<400> 3	
	cccgggatgc tagtaaataag tttaat	26
50	<210> 4	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
55	<400> 4	
	gtcgacttat tcgggcgaag acgacg	26
60	<210> 5	
	<211> 28	
	<212> DNA	
65	<213> Artificial	

ES 2 286 504 T3

	<400> 5	
	gcggccgctg gtgggtgcat gtatgtac	28
5	<210> 6	
	<211> 26	
	<212> DNA	
10	<213> Artificial	
	<400> 6	
15	ccgggggatg gtaagagtgt tagaga	26
	<210> 7	
	<211> 33	
20	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<400> 7	
25	ggatccgtcg actaaacggg ttctccaaa ccc	33
	<210> 8	
30	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
35	<400> 8	
	ggtacctga tcagataaag atagagat	28
40	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
45	<400> 9	
	gagctctcga gtggacggtg	20
50	<210> 10	
	<211> 28	
	<212> DNA	
55	<213> Artificial	
	<400> 10	
60	gcggccgcga gctcatcccg cttcaactc	28
65		

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> Roche vitamins AG	
5	<120> Production of zeaxanthin by <i>Phaffia</i>	
	<130> NDR5225-case 21415	
	<140> PCT/EP03/10574	
	<141> 2003-09-23	
10	<150> EP 02021599.2	
	<151> 2002-09-27	
	<160> 10	
15	<170> PatentIn version 3.1	
	<210> 1	
	<211> 26	
	<212> DNA	
20	<213> Artificial sequence	
	<220>	
	<223> Primer PZ1	
25	<400> 1	
	cccgggatga gcactgggc cgcaat	26
30	<210> 2	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
35	<220>	
	<223> Primer PZ2	
40	<400> 2	
	ggatcctcat gtattgegat ccgccc	26
45	<210> 3	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
50	<220>	
	<223> Primer EZ1	
	<400> 3	
55	cccgggatgc tagtaaataag ttaaat	26
	<210> 4	
60	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> Artificial sequence	
	<220>	
65	<223> Primer EZ2	

ES 2 286 504 T3

	<400> 4	
	gtcgacttat tcgggcgaag acgacg	26
5	<210> 5	
	<211> 28	
	<212> DNA	
10	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Primer GAP#1	
15	<400> 5	
	gcggccgctg gtgggtgcat gtatgtac	28
20	<210> 6	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
25	<220>	
	<223> Primer GAP#5	
30	<400> 6	
	cccggggatg gtaagagtgt tagaga	26
35	<210> 7	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
40	<220>	
	<223> Primer GAP#33	
	<400> 7	
45	ggatccgtcg actaaacggt tctctcaaa ccc	33
	<210> 8	
50	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> Artificial sequence	
	<220>	
55	<223> Primer GAP#4	
	<400> 8	
60	ggtaccttga tcagataaag atagagat	28
	<210> 9	
	<211> 20	
65	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	

ES 2 286 504 T3

	<220>	
	<223> Primer R#1	
5	<400> 9	
	gagctctcga gtggacggtg	20
10	<210> 10	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
15	<220>	
	<223> Primer R#2	
	<400> 10	
20	gcggccgcga gctcatcccg cttcactc	28
25		
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		