

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 700 552

②1 N° d'enregistrement national :

93 00463

⑤1 Int Cl⁵ : C 12 N 1/16, 15/01, C 12 P 5/00, 7/26, A 61 K 7/00,
31/015, A 23 L 1/303, A 23 K 1/16

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 19.01.93.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 22.07.94 Bulletin 94/29.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *PERNOD RICARD Société Anonyme
— FR.*

⑦2 Inventeur(s) : *Girard Patrick, Javelot Catherine,
Eliane, Jeannie et Vladescu Barbu, Dinu, Vladimir.*

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : *Cabinet Regimbeau Martin Schrimpf
Warcoin Ahner.*

⑤4 Mutants de *Phaffia rhodozyma*, procédé de production de β -carotène et utilisation de biomasse riche en β -carotène.

⑤7 La présente invention a pour objet des mutants de *Phaffia rhodozyma* bloqués dans l'étape de conversion du β -carotène dans la voie de bio-synthèse de l'astaxanthine.
La présente invention concerne également un procédé de production de β -carotène à l'aide de ces mutants à des fins d'utilisation dans la préparation de produits alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques.

FR 2 700 552 - A1



La présente invention concerne des mutants de Phaffia rhodozyma bloqués dans la voie de la carotenogénèse, des procédés d'obtention de β -carotène, l'utilisation de biomasse de ces mutants et l'utilisation de β -carotène.

5 Principalement connu comme la plus importante des provitamines A, le β -carotène fait actuellement l'objet d'études épidémiologiques et cliniques approfondies qui semblent lui attribuer des rôles physiologiques autres que ceux liés à la vitamine A.

10 En effet, la conversion du β -carotène en vitamine A dans la paroi intestinale étant régulée par le taux même de vitamine A dans le sang, une partie du β -carotène alimentaire reste à l'état de provitamine et exerce une fonction antioxydante vraisemblablement responsable de la protection contre certaines formes de cancer, athérosclérose, arthrite
15 rhumatoïde, cataracte sénile, parkinsonisme. Une dose journalière de 5,2 à 6,0 mg de β -carotène dans les aliments a été préconisée comme facteur important de prévention de ces maladies.

20 Comme le β -carotène est également un pigment naturel susceptible de remplacer certains colorants de synthèse et qu'il jouit d'une perception très favorable de la part des consommateurs, des efforts considérables se portent actuellement sur l'élaboration de nouveaux produits alimentaires
25 contenant du β -carotène, produits faisant partie de la catégorie des aliments de nouvelle génération, dits aliments "fonctionnels". Par ailleurs, il semblerait que le β -carotène soit un agent de protection solaire très efficace, d'où certaines applications dans l'industrie des produits cosmétiques.

30 Bien que les caroténoïdes en général et le β -carotène en particulier soient largement répandus dans le monde vivant, seulement les plantes et certains microorganismes possèdent les équipements enzymatiques nécessaires à leur biosynthèse à partir d'acétyl-CoA, via l'acide
35 mévalonique.

 Parmi les microorganismes, certains champignons et algues synthétisent des carotènes (dont le β -carotène), alors que les bactéries produisent essentiellement des xanthophyles. Les procédés de production de β -carotène en fermenteur proposés jusqu'à présent utilisent l'algue
35 *Dunaliella* (Ben Amotz & Avron, 1980) et les phycomycètes *Phycomyces blakesleeanus* (Murillo-Araujo et al, 82) et *Blakeslea trispora* (Ninet et Renault, 1979).

Quant aux levures, à une exception près, ces microorganismes ne font pas l'objet de procédés industriels de production de caroténoïdes. Le torulène, synthétisé par des levures rouges appartenant aux genres *Rhodotorula* et *Rhodospiridium*, ne présente qu'un intérêt mineur, alors
5 que les autres caroténoïdes identifiés chez les levures (dont le β -carotène) sont présents en d'aussi faibles quantités qu'une exploitation industrielle semble peu envisageable.

Le seul exemple de caroténoïde produit industriellement par emploi de levures est offert par l'astaxanthine, pigment caractéristique de la
10 levure *Phaffia rhodozyma*. Après optimisation de la production, l'astaxanthine ou la biomasse levurienne sont utilisés comme supplément dans l'alimentation du saumon, de la truite saumonée, des crustacés, des poules pondeuses, etc... (Brevet WO 91/02060).

Les caroténoïdes autres que le β -carotène ne présentent ni le
15 potentiel vitaminique du β -carotène, ni son effet protecteur antioxydant. Cependant, le rendement important du fonctionnement de la voie de biosynthèse de l'astaxanthine chez *Phaffia rhodozyma*, ainsi que l'alimentarité virtuelle de cette espèce nous ont suggéré de mettre à profit les propriétés de cette levure dans un procédé de production de β -
20 carotène.

Une production de β -carotène par levures serait donc intéressante car celles-ci sont, d'une part, plus faciles à cultiver en masse que d'autres microorganismes tels que les champignons et les plantes et, d'autre part, la biomasse de mutants de levures producteurs de β -carotène pourrait être
25 utilisée telle quelle dans les produits notamment alimentaires, diététiques cosmétiques, parapharmaceutiques ou pharmaceutiques.

La présente invention fournit des mutants de *Phaffia rhodozyma* bloqués dans la voie de la caroténogénèse et qui accumulent du β -carotène.

30 La voie de biosynthèse de l'astaxanthine chez *Phaffia rhodozyma* a été en partie élucidée et est présentée à la Figure 1.

Les mutants selon l'invention sont bloqués vraisemblablement dans l'étape de conversion du β -carotène en echinénone, notamment par traitement aux UV. Ces mutants sont incapables de produire de
35 l'astaxanthine.

La présente invention a en effet pour objet Procédé d'obtention de mutants de Phaffia rhodozyma producteur de β -carotène selon l'invention, caractérisé en ce que :

- 1) on traite une souche sauvage de Phaffia rhodozyma en culture par un agent mutagène physique ou chimique, et
- 2) on sélectionne les clones de couleur jaune obtenus après le traitement de l'étape 1).

Comme on l'a mentionné dans un mode de réalisation, à l'étape 1), on traite la souche sauvage de Phaffia rhodozyma par un agent mutagène consistant dans des rayons ultra-violet.

La présente invention a aussi pour objet un procédé de production de β -carotène par fermentation d'une souche mutante de levure de Phaffia rhodozyma selon l'invention.

On obtient une augmentation du rendement de production en β -carotène quand le milieu de culture est enrichi en acide mévalonique. (l'acide mévalonique (AMV) est en effet un précurseur du β -carotène dans la voie de biosynthèse de l'astaxanthine).

La présente invention fournit également des préparations brutes de β -carotène dépourvue de cellules viables obtenue à partir de la biomasse de mutants de Phaffia rhodozyma selon l'invention.

La présente invention a également pour objet l'utilisation de β -carotène obtenu par un procédé selon l'invention pour la préparation de produits alimentaires ou diététiques, cosmétiques, parapharmaceutiques ou pharmaceutiques.

La présente invention a aussi pour objet l'utilisation de biomasse, éventuellement déshydratée, d'un mutant de levure Phaffia rhodozyma selon l'invention, comme supplément de β -carotène dans la préparation de produits alimentaires ou diététiques, cosmétiques, parapharmaceutiques ou pharmaceutiques.

La présente invention fournit en outre un procédé de production de β -ionone par chauffage de cellules d'un mutant de levure Phaffia rhodozyma selon l'invention.

La présente invention a enfin pour objet l'utilisation de la biomasse d'une levure Phaffia rhodozyma selon l'invention comme source de β -ionone notamment dans la préparation de produits alimentaires ou diététiques, cosmétiques, parapharmaceutiques ou pharmaceutiques.

5 D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lumière des exemples qui vont suivre.

La Figure 1 représente la voie de biosynthèse de l'astaxanthine chez Phaffia rhodozyma.

10 La Figure 2 représente le spectre d'absorption de l'extrait de la souche PG 104 (A) et du produit de référence (β -carotène pur, Sygma) (B).

La Figure 3 représente l'analyse HPLC des extraits de la souche sauvage CBS 6938 de Phaffia rhodozyma (A), du mutant PG 104 (B) et des produits de référence alpha-carotène, (Sygma) et β -carotène.

15 EXEMPLE 1

Obtention des mutants

Les cellules de la souche sauvage CBS 6938 de Phaffia rhodozyma sont cultivées sur un milieu liquide (YPG) contenant 1% d'extrait de levure, 1% de bactopeptone et 2% de glucose, sous agitation (150 rpm) à 20 25°C). Les cultures âgées de 72 heures sont centrifugées 5 mn à 3.000 g et les cellules lavées deux fois à l'eau distillée et traitées aux UV pendant 50 sec à 35 cm d'une lampe germicide, ce qui correspond à une dose de 1.789 j x s⁻¹ x cm². Le taux de survie est d'environ 10%. Les cellules traitées sont étalées sur des boîtes de YPG solide et incubées à 25°C pendant 72 25 heures. Sur 5 x 10⁴ colonies examinées, quelques colonies blanches ont été repérées, ainsi que deux colonies de couleur jaune (PG 104 et PG 126) contrastant avec la couleur rouge des colonies sauvages. Le mutant PG 104 a fait l'objet des expérimentations ultérieures.

30 EXEMPLE 2

Identification des caroténoïdes du mutant PG 104

100 ml de milieu SD (50,67% de bacto-yeast nitrogen base sans acides aminés et 2% de glucose) sont placés dans des fioles Erlenmayer de 1.000 ml et inoculés avec 10⁶ cellules/ml de la souche PG 104 prélevées 35 d'une préculture en YPG. Les cultures sont incubées à 25°C sous agitation (150 rpm) et au bout de 72 heures, les cellules sont récoltées par

centrifugation et soumises à un traitement lytique : à 200 ml de suspension cellulaire dans du tampon citrate-phosphate 0,1 M, pH 5,6, contenant 10^7 cpm, on ajoute 6 mg/ml de préparation enzymatique (Novozym 234) ; après une incubation de 60 mn à 25°C sous agitation faible, l'examen microscopique montre une lyse des parois cellulaires à pratiquement 100%. La préparation de protoplastes est alors traitée à l'acétone et les caroténoïdes sont extraits à l'éther de pétrole. Le spectre UV-VIS de l'extrait (Fig. 2) est identique à celui du produit de référence (β -carotène pur, Sygma).

10 L'analyse par HPLC (Fig. 3) sur colonne Microbondapak RP 18 (Waters), avec comme phase mobile du méthanol, montre dans le cas du mutant PG 104 la présence d'un seul pic, correspondant à celui du β -carotène pur, contrairement à la souche sauvage qui contient de l'astaxanthine comme pic majeur, mais aussi, en faibles quantités, d'autres intermédiaires probables de la voie des caroténoïdes.

15 Une comparaison avec les proportions relatives de différents caroténoïdes chez une souche sauvage (Tableau I) montre clairement que le mutant PG 104 produit pratiquement en exclusivité du β -carotène. Il correspond probablement à un blocage mutationnel au niveau de l'étape
20 de conversion du β -carotène en échinénone.

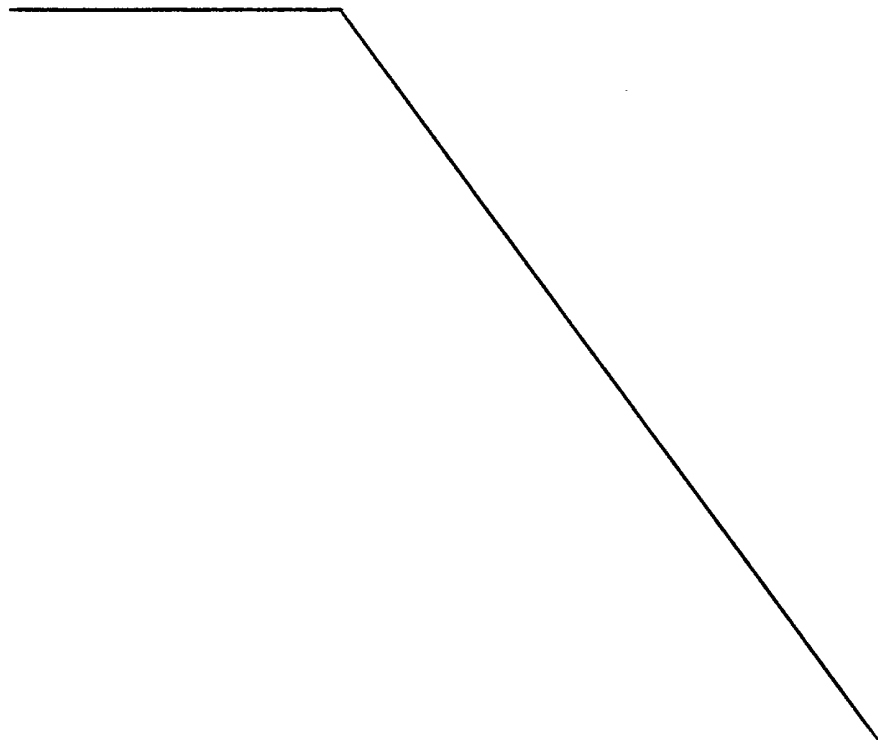


TABLEAU 1

CAROTENOIDES DE PHAFFIA RHODOZYMA (% DES CAROTENOIDES TOTAUX)

	SAUVAGE *	MUTANT (P-104)
Neurosporene	0,01	0
Lycopene	0,01	?
γ -Carotene	0,01	0
β -Carotene	2 - 2,5	92
Echinenone	2 - 4	0
Hydroxyechinenone	3 - 4	0
Phoenicoxanthin	5 - 7	0
Astaxanthin	83 - 87	0

* D'après *Andrewes et al* (1976)

EXEMPLE 3**Production de β -carotène avec le mutant PG 104**

Différents milieux et conditions de culture, ainsi que l'effet de certains suppléments sur la biosynthèse de β -carotène par PG 104 ont été testés, afin d'établir les paramètres permettant d'augmenter cette production. Les résultats sont présentés dans le tableau II.

A la suite de ces tests, les paramètres culturels suivants ont été choisis pour une production optimum de β -carotène :

- Milieu de culture : SGly-HC-AMV
- 10 - Inoculum : 10^6 cpm
- Volume : 1/10 du volume de la fiole
- Température : 25°C
- Agitation : 150 rpm

Dans ces conditions, on obtient au bout de 96 heures jusqu'à 10 mg de β -carotène par litre de culture.

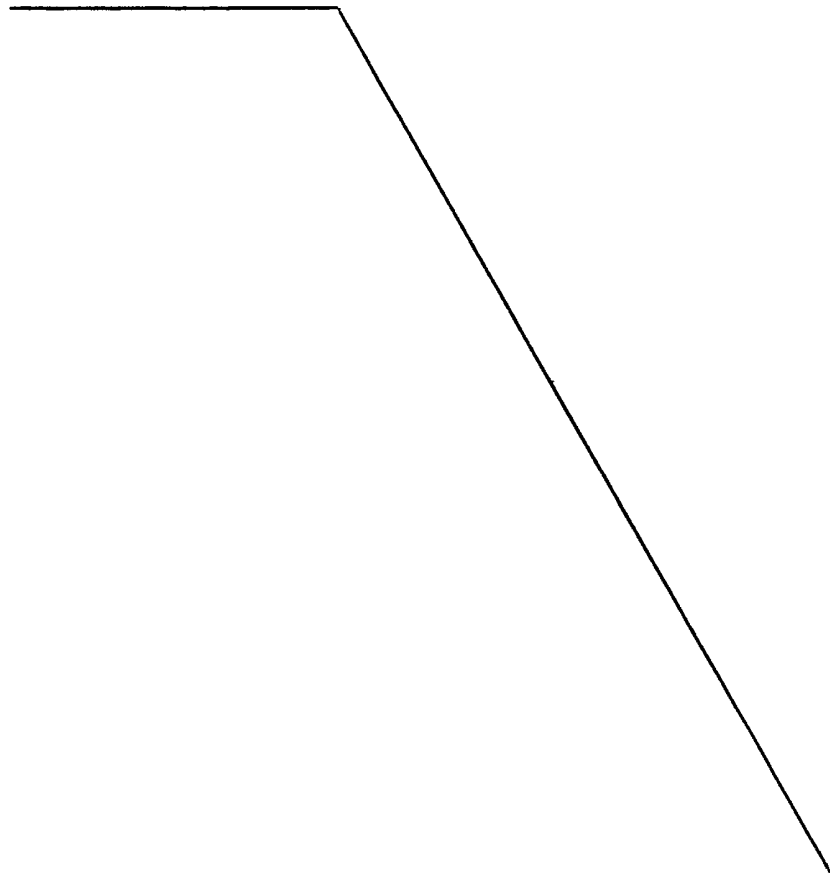


TABLEAU 2

PRODUCTION DE β-CAROTENE DANS DIFFERENTS MILIEUX DE CULTURE

Milieu	β -CAROTENE	
	mg/l	mg/g poids sec
YPG	0,37	0,07
YPGly	2,35	0,32
SD	1,80	0,50
SGly	0,05	0,12
PDB	2,30	0,29
VG	2,70	0,39
VGly	0,46	0,31
SD-AMV	4,70	1,12
SGly-HC	7,90	0,87
SGly-AMV-HC	9,95	1,08

YPG = 1 % EXtrait de levure, 1 % Bactopeptone, 2 % Glucose

YPGly = 1 % Extrait de levure, 1 % Bactopeptone, 3 % v/v Glycérol

SD = 0,67 % Bacto-yeast nitrogen base, 2 % Glucose

SGly = 0,67 % Bacto-yeast nitrogen base, 3 % v/v Glycérol

PDB = 2,4 % Potato dextrose (Difco)

VG = 2 % Extrait de viande, 2 % Glucose

VGly = 2 % Extrait de viande, 3 % (v/v) Glycérol

SD-AMV = SD + 500 mg/l acide mévalonique

SGly-HC = SGly + 5 g/l hydrolysate de caséine

SGly-HC-AMV = SGly + 5 g/l hydrolysate de caséine + 500 mg/l acide mévalonique

EXEMPLE 4**Préparation brute de β -carotène à partir de cellules du mutant PG 104 de *Phaffia rhodozyma***

Les cellules de PG 104 cultivées dans les conditions standard sont
5 récoltées par centrifugation et lavées une fois à l'eau distillée. A 1 g (poids
humide) de cellules, on ajoute 100 ml d'éthanol absolu et la suspension est
agitée 1 heure à 150 rpm. Les cellules sont récoltées par centrifugation et
le culot est réparti en couches de 1-2 mm d'épaisseur sur des boîtes de *Petri*
et séché 24 heures à température ambiante. On obtient une poudre qui
10 contient 2 mg de β -carotène par gramme. Des aliquots de cette poudre sont
étalés sur des boîtes de YPG solide et l'absence de croissance au bout de 2
semaines montre que la préparation ne contient aucune cellule vivante.

Cette préparation peut être utilisée comme supplément de β -carotène
dans des jus de fruits, et tout autre produit alimentaire, ainsi que dans des
15 produits cosmétiques et dans l'alimentation animale.

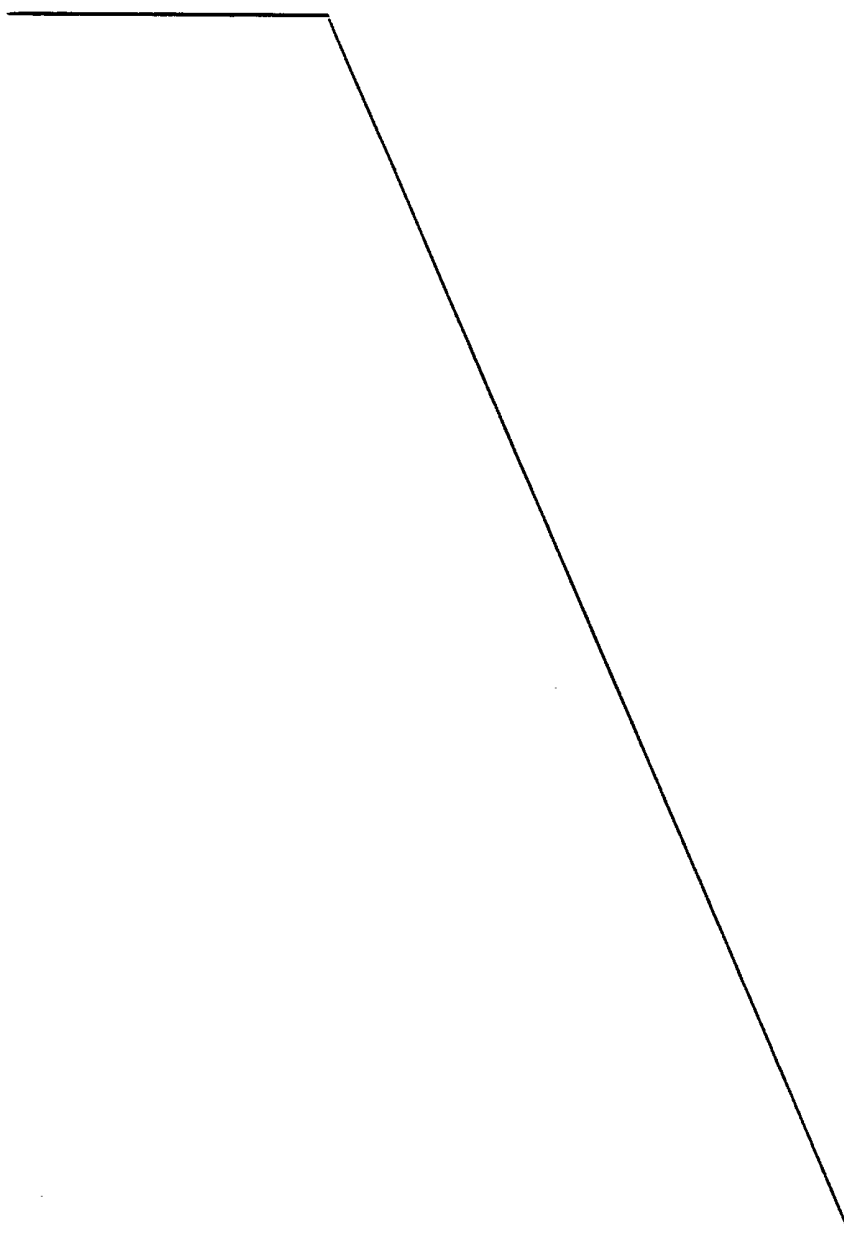
EXEMPLE 5**Préparation riche en β -carotène à partir de cellules de *Phaffia rhodozyma*
PG 104**

20 Les cellules récoltées dans 100 ml de culture sont traitées au Novozym
(comme décrit dans l'exemple 2) et extraites 5 fois à l'acétone. Les extraits
sont réunis et les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation. Le
surnageant acétonique est placé dans une ampoule à décanter ; 10 ml
d'éther de pétrole et 1 ml de NaCl saturé sont ajoutés. On récupère la phase
25 supérieure (éther de pétrole) fortement coloré ; la phase acétonique est
extraite une deuxième fois à l'éther de pétrole et les extraits en éther sont
réunis, filtrés, séchés sur Na₂ SO₄ anhydre et repris dans 1 ml d'éther de
pétrole. On confirme l'identité du caroténoïde extrait par
spectrophotométrie. L'extrait final contient 1 g de β -carotène par litre.

30

EXEMPLE 6**Production de β -ionone au cours de l'élaboration de boissons distillées**

5 La β -ionone est un arôme cher utilisé dans l'industrie alimentaire. Du moût de malt de distillerie (densité initiale 1060), est fermenté avec une souche de distillerie traditionnelle, jusqu'à une densité de 997. Avant la distillation, on ajoute 1 g de cellules de Phaffia rhodozyma PG 104 traitées préalablement au Novozym. Dans le low wine obtenu après distillation, on met en évidence par GC-MS la présence de traces de β -ionone, absentes dans le produit témoin.



BIBLIOGRAPHIE

Ben-Amotz A., Avron M. (1983) On factors which determine massive β -carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. Plant
5 Physiol. 72 : 593-597.

Murillo-Araujo F.J., Calderon I.L., Lopez-Diaz I., Cerda-Olmedo E. (1978)
Carotene superproducing strains of *Phycomyces*. Appl. Environ.
10 Microbiol. 36 : 639-642.

Ninet L., Renaut J. (1979) In "Microbial Technology", H.J. Peppler & D.
Perlman eds., 2nd Ed. Vol. 1, pp. 529-544, Academic Press, New York.

Igene Biotechnology, Inc. (1989) Processes for in vivo production of
15 astaxanthin and *Phaffia rhodozyma* yeast of enhanced astaxanthin
content. Brevet WO 91/02060.

Andrewes A.G., Phaff H.J., Starr M.P. (1976) Carotenoids of *Phaffia
rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast. Phytochemistry 15 : 1003-
20 1007.

REVENDICATIONS

1. Mutants de Phaffia rhodozyma bloqués dans l'étape de conversion du β -carotène dans la voie de bio-synthèse de l'astaxanthine.

5

2. Procédé d'obtention de mutants de Phaffia rhodozyma producteurs de β -carotène selon la revendication 1, caractérisé en ce que :

- 1) on traite une souche sauvage de Phaffia rhodozyma en culture par un agent mutagène physique ou chimique, et
- 2) on sélectionne les clones de couleur jaune obtenus après le traitement de l'étape 1).

10

3. Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce que, à l'étape 1), on traite la souche sauvage de Phaffia rhodozyma par un agent mutagène consistant dans des ultra-violets.

15

4. Procédé de production de β -carotène par fermentation d'une souche mutante de levure de Phaffia rhodozyma selon la revendication 1.

20

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que le milieu de culture est enrichi en acide mévalonique.

6. Préparation brute de β -carotène dépourvue de cellules viables obtenue à partir de la biomasse de mutants de Phaffia rhodozyma selon la revendication 1.

25

7. Utilisation de β -carotène obtenu par un procédé selon la revendication 4 ou 5 pour la préparation de produits alimentaires ou diététiques, cosmétiques, parapharmaceutiques ou pharmaceutiques.

30

8. Utilisation de biomasse, éventuellement déshydratée, d'un mutant de levure Phaffia rhodozyma selon la revendication 1, comme supplément de β -carotène dans la préparation de produits alimentaires ou diététiques, cosmétiques, parapharmaceutiques ou pharmaceutiques.

35

9. Procédé de production de β -ionone par chauffage de cellules d'un mutant de levure Phaffia rhodozyma selon la revendication 1.

5 10. Utilisation de la biomasse d'une levure Phaffia rhodozyma selon la revendication 1 comme source de β -ionone notamment dans la préparation de produits alimentaires ou diététiques, cosmétiques, parapharmaceutiques ou pharmaceutiques.

1 / 3

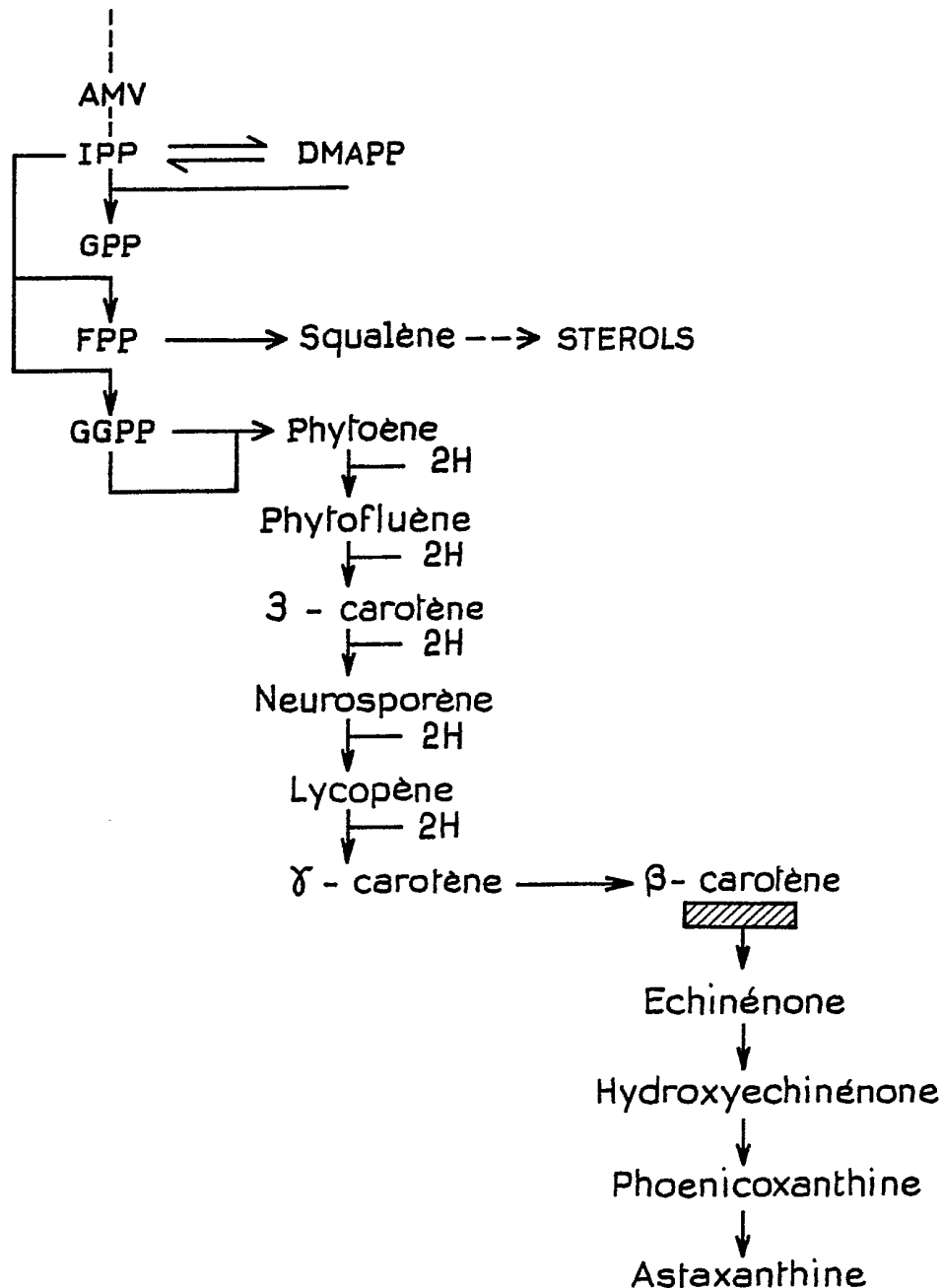
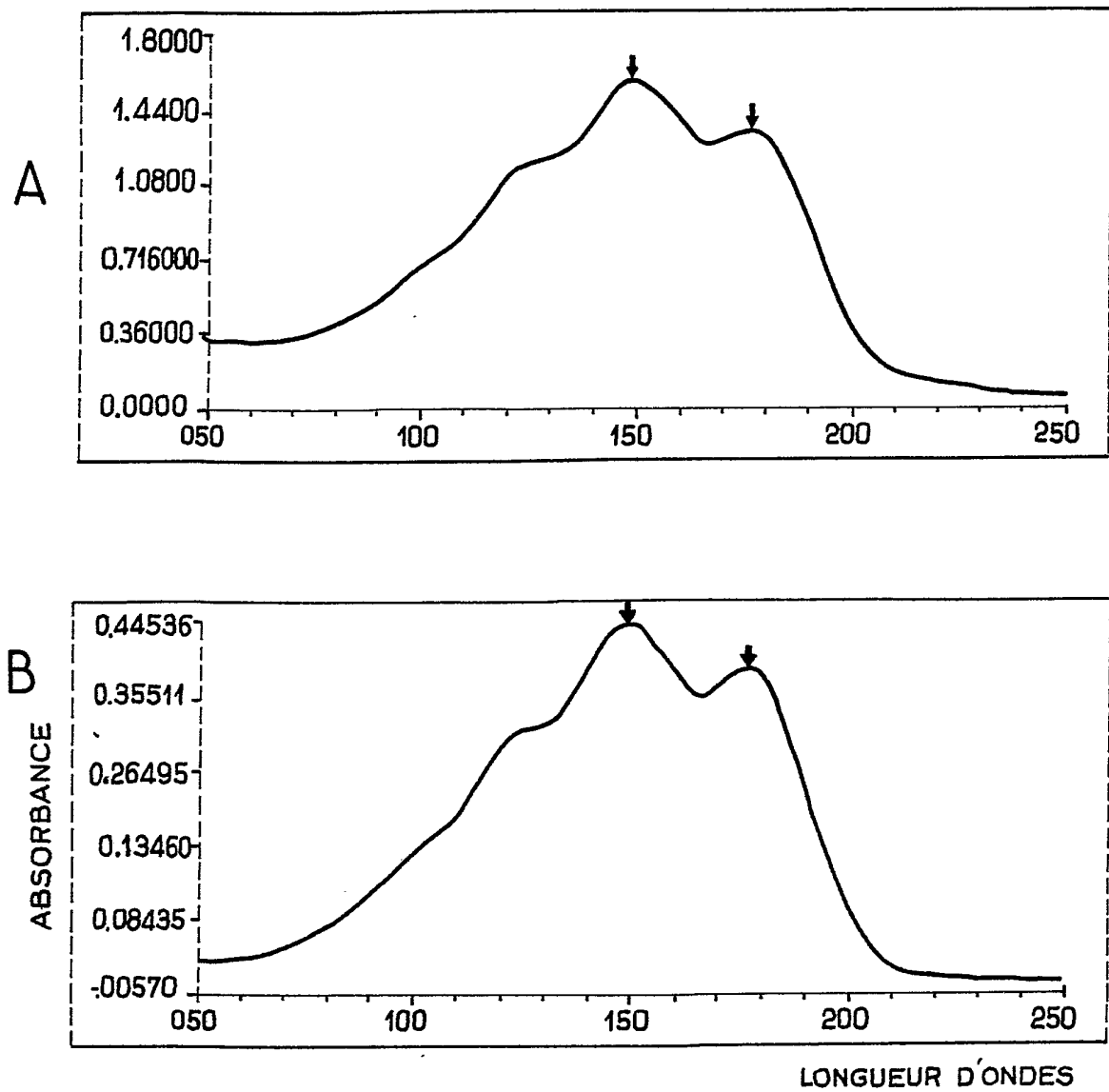


FIG. 1 : La voie de biosynthèse de l'astaxanthine chez *Phaffia rhodozyma*

AMV = acide mévalonique, IPP = isopentényl pyrophosphate, DMAPP = diméthyl-allyl pyrophosphate, GPP = géranyl pyrophosphate, FPP = farnésyl pyrophosphate, GGPP = géranylgéranylpyrophosphate; la barre hachurée indique le site probable de la mutation.

2 / 3

FIG. 2

Spectre d'absorption de l'extrait de la souche PG 104 (A)
et du produit de référence (β -carotène pur, Sigma) (B)

3 / 3

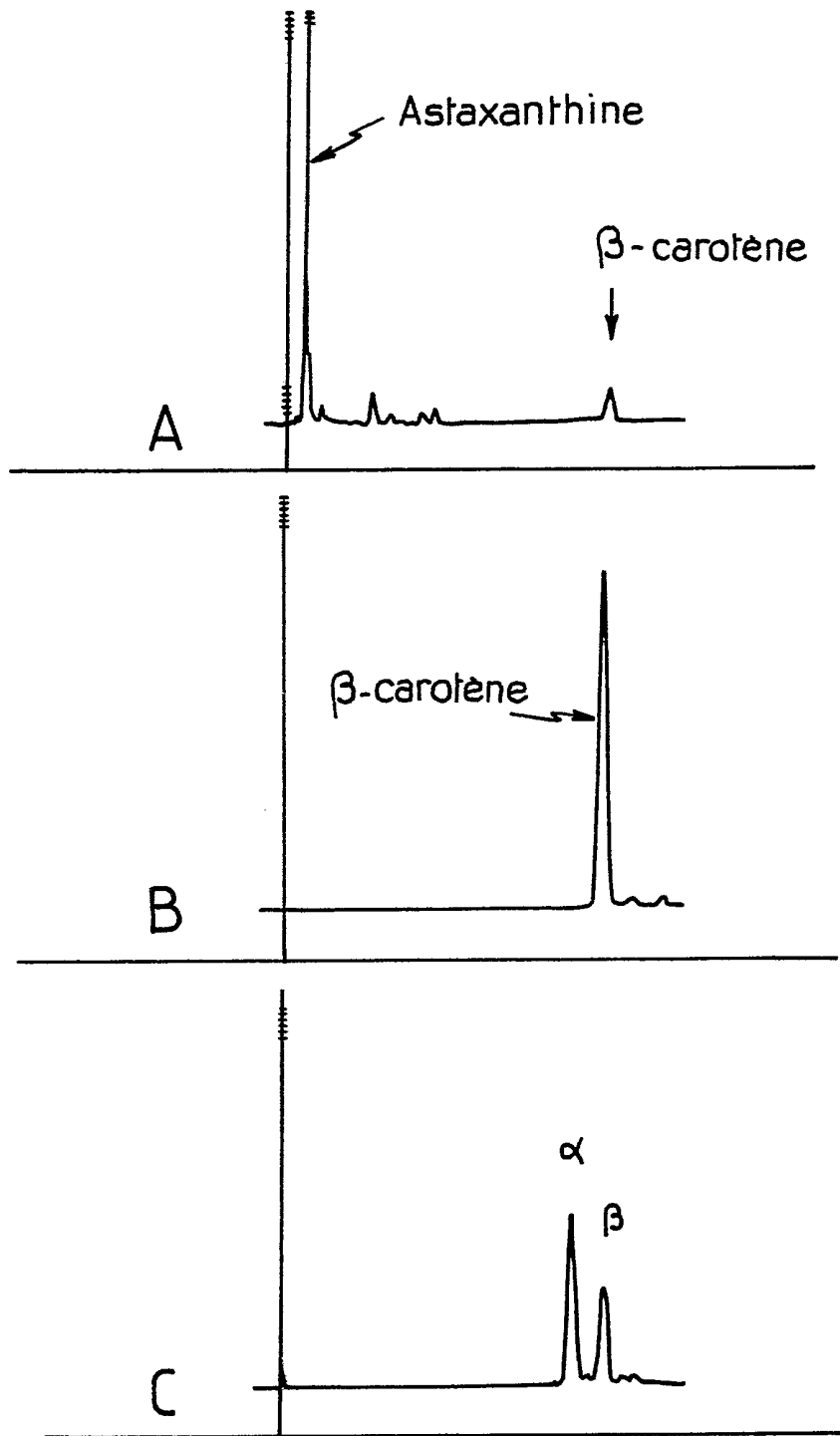


FIG.3 : Analyse HPLC des extraits de la souche sauvage CBS 6938 de *Phaffia rhodozyma* (A), du mutant PG 104 (B) et des produits de référence α -carotène, Sigma et β -carotène, Sigma (C).

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE PRELIMINAIRE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FR 9300463
FA 480709

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY vol. 56, no. 9, Septembre 1990, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY pages 2944 - 2945 LEWIS, M.J. ET AL. 'Selection of astaxanthin-overproducing mutants of Phaffia rhodozyma with beta-ionone'	1-2,4
Y	* le document en entier * ----	3,5,9-10
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 8530, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 85-181407 & JP-A-60 110 285 (NIPPON CARBIDE KOGY KK) 15 Juin 1985 * abrégé * ----	3,5
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 72, no. 13, 30 Mars 1970, Columbus, Ohio, US; abstract no. 65371c, LAROE, E. & SHIPLEY, P. 'Whisky composition: formation of alpha- and beta-ionone by the thermal decomposition of beta-carotene' page 250 ; * abrégé * & J.AGR.FOOD CHEM., 1970, 18(1); 174-5 ----	9-10
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		C12P C12R C12N A61K A23K A23L
A	APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY vol. 55, no. 1, Janvier 1989, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY pages 116 - 124 AN, G.-H. ET AL. 'Isolation of Phaffia rhodozyma mutants with increased astaxanthin content' * page 118, colonne de droite, ligne 29 - ligne 31 * -----	1-4
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
01 OCTOBRE 1993		ANDRES S.M.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>		
<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

2

EPO FORM 1503 03.82 (P0413)