

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393572** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.08.27

(22) Дата подачи заявки
2021.07.27

(51) Int. Cl. *C12P 23/00* (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
A61K 8/67 (2006.01)
A61K 31/07 (2006.01)
C12P 7/62 (2006.01)

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РЕТИНИЛАЦЕТАТА**

(86) **PCT/EP2021/070909**

(87) **WO 2023/006179 2023.02.02**

(71) Заявитель:
ДСМ АйПи АССЕТС Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:

**Хьюстон Питер Луис, Виас Вальмик
Канубхай, Симбор-Награбска Анна,
Дотен Рид Шадбурн, Фаррелл
Кристофер Марк, Лэм Иган (CH)**

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) Настоящее изобретение касается нового способа получения ретинилацетата в клетке-хозяине, в частности в клетке маслянистых дрожжей, например *Yarrowia*, причем чистота продукта повышается с уменьшением нежелательных побочных продуктов. В частности, новый способ включает ферментацию в присутствии этанола, такую как процесс периодической ферментации с подпиткой. Такой способ особенно применим в биотехнологическом процессе получения витамина А.

A1

202393572

202393572

A1

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РЕТИНИЛАЦЕТАТА

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение касается нового способа получения ретинилацетата в клетке-хозяине, в частности, в клетке маслянистых дрожжей типа *Yarrowia*, причем чистота продукта повышается с уменьшением нежелательных побочных продуктов. В частности, новый способ включает ферментацию в присутствии этанола, такую, как периодическая ферментация с подпиткой. Такой способ особенно применим в биотехнологическом процессе получения витамина А.

Уровень техники

Современные химические методы получения ретиноидов, включая витамин А и его предшественники, имеют некоторые нежелательные характеристики, такие, например, как высокое потребление энергии, сложные стадии очистки и/или нежелательные побочные продукты. Поэтому за последние десятилетия исследовались и другие подходы к получению ретиноидов, включая витамин А и его предшественники, включающие стадии микробиологической конверсии, которые могли бы привести к более экономичному, а также и экологичному производству витамина А.

В целом биологические системы, производящие ретиноиды, трудно осуществимы в промышленности и/или производят соединения в таких низких количествах, что их выделение в коммерческих масштабах становится нецелесообразным. К наиболее лимитирующим факторам относятся нестабильность промежуточных соединений в таких биологических системах и/или сравнительно высокое производство побочных продуктов, таких, например, как ретиниловые эфиры жирных кислот (FARE), особенно при использовании маслянистых клеток хозяина при культивировании на растительных маслах или на глюкозе в качестве источника углерода.

Хотя с нестабильностью можно справиться путем экспрессии высокоспецифичных ацетилирующих ферментов (ATF) в клетках-хозяевах, приводящей к повышенному накоплению ретинилацетата, однако при производстве витамина А все еще «пропадает» относительно большой процент ретинола, т.е. он превращается в нежелательные побочные продукты, в том числе FARE, которые с трудом поддаются очистке и образуют не кристаллы, а воск. Таким образом, высокие концентрации FAREs ограничивают крупномасштабное промышленное производство чистых продуктов.

Итак, существует острая потребность в повышении чистоты и/или производительности при получении ретинилацетата с использованием дрожжевых клеток, особенно клеток маслянистых дрожжей типа *Yarrowia*.

Сущность изобретения

Неожиданно авторы изобретения обнаружили, что получение ретиноидов улучшается при ферментации в присутствии этанола, особенно в процессе периодической ферментации с подпиткой, что ведет к уменьшению или устранению примесей, в том числе FARE, к повышению содержания ретинилацетата и/или общего количества ретиноидов.

В частности, настоящим изобретением предусмотрен способ получения ретинилацетата в грибной клетке-хозяине, предпочтительно в клетке маслянистых дрожжей типа *Yarrowia*, включающий культивирование клетки-хозяина в присутствии этанола, добавляемого во время ферментации, особенно при периодической ферментации с подпиткой, при которой снижается или устраняется образование побочных продуктов, в том числе FARE, предпочтительно примерно на 50-100% в пересчете на общее количество ретиноидов в сравнении с ферментацией без этанола, в особенности в сравнении с процессом (ферментации) в присутствии триглицеридов, в частности растительного масла, как определено здесь.

В настоящем изобретении термин «побочные продукты» в связи с ферментативным получением ретиноидов, означает ретиноиды, образующиеся в процессе ферментации, за исключением ретинилацетата. Образование побочных продуктов, которое следует уменьшить или устранить в процессе ферментации, включает, в частности, образование FARE, необязательно также присутствие ретинола или ретиналя в среде культивирования, которые могут быть отделены от ретинилацетата.

В настоящем изобретении ферментация «в присутствии этанола» или «добавление этанола во время ферментации», в частности, относится к процессу периодической ферментации с подпиткой, в котором периодическая фаза включает концентрацию этанола примерно 5% (по объему) или меньше, такую, как, например около 5, 4,5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5, 1% при добавлении в среду культивирования во время периодической фазы ферментации. Подача этанола контролируется по измерению pH и/или DO, как это известно в данной области, обычно с подачей примерно 100% этанола и с заданным значением DO от 40 до 20%. Необязательно либо периодическая фаза, либо подача также включает глюкозу, к примеру, в среду культивирования добавляют 20, 15, 10, 8, 5, 3, 2% или меньшее количество глюкозы во время периодической фазы ферментации или же соотношение этанола к глюкозе составляет в пределах 9:1, 8:2, 7:3.

В настоящем изобретении ферментация «в присутствии триглицеридов, в особенности растительного масла» или «в присутствии триглицеридов, в особенности с добавлением растительного масла в процессе ферментации», в частности, относится к

процессу периодической ферментации с подпиткой, в котором периодическая фаза включает концентрацию около 10% триглицеридов (по объему) или меньше, в особенности растительного масла, такую, как, например, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, 1% при добавлении в среду культивирования во время периодической фазы ферментации. Масло, которое предназначено для использования, в частности, представляет собой растительное масло, такое, как, например, масло, полученное из кукурузы, сои, оливковое, подсолнечное, каноловое, хлопковое, рапсовое, кунжутное, сафлоровое, виноградное либо их смеси, содержащие соответствующие свободные жирные кислоты, такие, как, например, олеиновая кислота, пальмитиновая кислота или линолевая кислота.

В одном предпочтительном воплощении настоящего изобретения предусмотрен описанный здесь способ снижения образования FARE в процессе получения ретинилацетата, при котором содержание побочных продуктов, в том числе FARE, может снижаться почти на 100%, т.е. более или менее устраняться, причем данный процесс включает ферментацию в присутствии этанола, как определено здесь. По сравнению с процессом ферментации в присутствии триглицеридов, как определено здесь, образование FARE может снижаться по меньшей мере на 50%, например, на 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100%, т.е. устраняется образование FARE.

Предпочтительно настоящим изобретением предусмотрен такой способ получения ретинилацетата, как определено здесь, при котором содержание FARE, образующихся во время ферментации, составляет менее 25%, например, менее 20, 15, 10, 8, 5, 3, 2, 1% в пересчете на общее количество ретиноидов.

Далее, настоящим изобретением предусмотрен такой способ получения ретинилацетата в грибной клетке-хозяине, предпочтительно в клетке маслянистых дрожжей типа *Yarrowia*, который включает ферментацию в присутствии этанола, как определено здесь, при котором содержание ретинилацетата может повышаться по меньшей мере на 25%, например, на 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100% или больше в пересчете на общее количество ретиноидов в сравнении с соответствующим процессом в отсутствие этанола, особенно в сравнении с процессом ферментации в присутствии триглицеридов, как определено здесь.

Так, в одном конкретном воплощении настоящего изобретения предусмотрен описанный здесь способ получения ретинилацетата в грибной клетке-хозяине, как определено здесь, при котором содержание ретинилацетата, образующегося во время ферментации, составляет по меньшей мере 50-80%, например, по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 87, 90, 95, 98% или вплоть до 100% в пересчете на общее количество ретиноидов, причем данный способ включает ферментацию в присутствии этанола, как

определено здесь.

В следующем аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ повышения общего содержания ретиноидов, при котором повышение содержания ретиноидов составляет по меньшей мере 30%, например, по меньшей мере 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80% или больше, причем данный способ включает ферментацию в присутствии этанола, как определено здесь, по сравнению с соответствующим процессом в отсутствие этанола, в частности, по сравнению с процессом ферментации в присутствии триглицеридов, как определено здесь.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен описанный здесь способ, в котором продуцирующую ретинилацетат клетку-хозяин, предпочтительно клетку маслянистых дрожжей типа *Yarrowia*, культивируют в подходящих условиях, включающих ферментацию в присутствии этанола, как определено здесь, при этом содержание FARE, образующихся во время ферментации, составляет менее 25%, предпочтительно менее 10%, а содержание ретинилацетата составляет по меньшей мере 50-80%, предпочтительно по меньшей мере 70, 80, 85, 87, 90, 95, 98% в пересчете на общее количество ретиноидов. По сравнению со способом в отсутствие этанола во время ферментации, в частности, при культивировании клетки-хозяина в процессе ферментации в присутствии триглицеридов, в частности растительного масла, как определено здесь, содержание ретинилацетата может повышаться почти на 100% или больше, а содержание FARE может снижаться в пределах от 10 до 1% или даже до менее 1% или даже устраняться, исходя из общего количества ретиноидов.

Настоящим изобретением предусмотрено применение продуцирующей ретинилацетат клетки-хозяина, в частности, грибной клетки-хозяина, предпочтительно клетки маслянистых дрожжей типа *Rhodospiridium*, *Lipomyces* или *Yarrowia*, предпочтительно *Yarrowia*, более предпочтительно *Yarrowia lipolytica*, в описанном здесь способе, например, в способе ферментации, включающем добавление этанола во время ферментации, как определено здесь, при этом процесс предпочтительно представляет собой периодическую ферментацию с подпиткой, причем периодическая фаза включает концентрацию этанола примерно 5% (об/об) или меньше, в частности от 2 до 1% (об/об) этанола в периодической фазе. Предпочтительно подходящие клетки-хозяева экспрессируют гены, кодирующие гетерологичные ферменты ЕС-класса [ЕС 2.3.1.84], катализирующие ферментативное превращение ретинола в ретинилацетат. Подходящие штаммы, экспрессирующие такие ATF, описаны, например, в заявках WO 2019/058001 или WO 2020/141168.

Предпочтительно клетка-хозяин, используемая в настоящем изобретении,

экспрессирует гетерологичный ацетилирующий фермент (ATF), в частности ATF гриба, содержащий высоко консервативную частичную аминокислотную последовательность, состоящую по меньшей мере из 7 аминокислотных остатков, выбранных из [NDEHCS]-H-x(3)-D-[GA] (мотивы представлены в синтаксисе Prosite, как определено в https://prosite.expasy.org/scanprosite/scanprosite_doc.html), где «x» означает произвольную аминокислоту, а центральный гистидин является частью связывающего кармана фермента, причем предпочтительно мотив из 7 аминокислот выбран из [NDE]-H-x(3)-D-[GA], более предпочтительно из [ND]-H-x(3)-D-[GA] и наиболее предпочтительно из N-H-x(3)-D-[GA], что соответствует положениям от N218 до G224 в полипептиде, имеющем SEQ ID NO: 18. Примеры таких ферментов могут быть предпочтительно выбраны из ферментов *L. mirantina*, *L. fermentati*, *S. bayanus* или *W. anomalus*, например, LmATF1 с последовательностью SEQ ID NO: 18, SbATF1, LffATF1, LfATF1, Wa1ATF1 или Wa3ATF1, как описано в WO 2019/058001, более предпочтительно такие ATFs содержат одну или несколько замен аминокислот в последовательности, которая по меньшей мере на 20%, например, на 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 97, 98, 99% и вплоть до 100% идентична SEQ ID NO: 18, причем эти одна или несколько замен аминокислот локализованы в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам, выбранным из группы, состоящей из положений 68, 69, 72, 73, 171, 174, 176, 178, 291, 292, 294, 301, 307, 308, 311, 312, 320, 322, 334, 362, 405, 407, 409, 480, 483, 484, 490, 492, 520, 521, 522, 524, 525, 526 и их комбинаций, предпочтительно представленных в таблице 4

WO 2020/141168, наиболее предпочтительно указанные ATFs содержат одну или несколько замен аминокислот в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам 69, 407, 409, 480, 484 и их комбинациям SEQ ID NO: 18.

В одном конкретном воплощении клетка хозяин, используемая в способе по настоящему изобретению, содержит замену аминокислоты в положении, соответствующем остатку 69 в полипептиде SEQ ID NO: 18, которая приводит к наличию аспарагина, серина или аланина в этом положении, например, замену гистидина на аспарагин (H69N), серин (H69S) или аланин (H69A), предпочтительно H69A. Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalus* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*, необязательно в сочетании с заменой аминокислоты в положении, соответствующем остатку 407 в полипептиде SEQ ID NO: 18, которая приводит к наличию изолейцина в этом положении, например, с заменой валина на изолейцин (V407I), необязательно в сочетании с заменой аминокислоты в положении, соответствующем остатку 409 в полипептиде по SEQ ID NO: 18, которая приводит к наличию аланина в этом положении, например, с заменой глицина

на аланин (G409A), необязательно в сочетании с заменой аминокислоты в положении, соответствующем остатку 480 в полипептиде по SEQ ID NO: 18, которая приводит к наличию в этом положении глутаминовой кислоты, лизина, метионина, фенилаланина или глутамин, например, с заменой серина на глутаминовую кислоту (S480E), лизин (S480L), метионин (S480M), фенилаланин (S480F) или глутамин (S480Q), необязательно в сочетании с заменой аминокислоты в положении, соответствующем остатку 484 в полипептиде по SEQ ID NO: 18, которая приводит к наличию в этом положении лейцина, например, с заменой изолейцина на лейцин (I484L). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalus* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. В наиболее предпочтительном воплощении ATF, используемый в способе по настоящему изобретению, представляет собой модифицированный ATF, содержащий аминокислотные замены S480Q_G409A_V407I_H69A_I484L и получаемый из *Lachancea mirantina*.

В настоящем изобретении термин «клетка-хозяин» охватывает клетки, продуцирующие ретинилацетат, т.е. способные синтезировать ретинол и экспрессировать ATF, как определено здесь, образуя ретинилацетат при таком содержании, как определено здесь, в пересчете на общее количество ретиноидов, продуцируемых указанной клеткой-хозяином. Необязательно такая клетка-хозяин, кроме того, способна вырабатывать каротиноиды. «Грибная клетка-хозяин», в частности, включают и дрожжевые клетки, т.е. дрожжевые клетки, продуцирующие ретинилацетат, в том числе, но без ограничения, *Yarrowia*, *Rhodospordium* или *Lipomyces*.

Необязательно клетка-хозяин типа *Yarrowia*, способная продуцировать ретинилацетат при превращении ретинола, экспрессирует и другие ферменты, используемые для биосинтеза бета-каротина, и/или также используемые для катализа превращения бета-каротина в ретиналь и/или ретиналя в ретинол. Специалистам должно быть известно, какие гены следует использовать/экспрессировать для биосинтеза бета-каротина и/или биоконверсии бета-каротина в ретинол. Такую клетку-хозяин, способную также экспрессировать гены ATF, как определено здесь, и/или другие гены, необходимые для биосинтеза витамина А, культивируют в водной среде, включая добавление этанола во время ферментации, необязательно с добавлением соответствующих питательных веществ в таких аэробных или анаэробных условиях, которые, как это известно специалистам, обеспечивают получение ретинилацетата. Предпочтительно ферментация проводится в периодическом режиме с подпиткой, причем периодическая фаза включает концентрацию этанола около 5% или меньше, в частности, от 2 до 1% этанола, и с подачей 100% этанола, например, как представлено в настоящей заявке. В частности, ферментация

проводится с перемешиванием в реакторах периодического режима с подпиткой. Ферментация может длиться от 5 до 14 дней, например, около 118 часов. Продукты ферментации, включая ретинилацетат, можно собирать при культивировании в подходящий момент, например, когда заполнится резервуар при проведении подпитки. В зависимости от клетки-хозяина предпочтительно получение ретиноидов типа витамина А, его предшественников и/или производных типа ретиналя, ретинола, ретинилацетата, особенно ретинилацетата, может варьировать, как это известно специалистам. Ретиноиды, включая, без ограничения, ретинол, ретинилацетат, витамин А, могут применяться в качестве ингредиентов/композиций в пищевой, кормовой, фармацевтической или косметической промышленности. Культивирование и выделение продуцирующих бета-каротин и ретиноиды клеток-хозяев из числа *Saccharomyces* описано, например, в WO 2008/042338.

В одном воплощении клетка-хозяин, используемая в способе по настоящему изобретению, может содержать и другие модификации, такие, как модификации активности эндогенных ферментов, вызывающих превращение ретинола в FARE. В частности, такие модификации включают устранение активности эндогенных липаз, т.е. активности ферментов, участвующих в предварительном расщеплении триглицеридных масел, таких, как растительное масло, на глицерин и жирные кислоты, которые обычно экспрессируются в маслянистых клетках хозяина. Подходящие ферменты для модификации в клетке-хозяине, используемой в способе по настоящему изобретению, могут быть выбраны из эндогенных ферментов, принадлежащих к классу EC 3.1.1.-, включая, без ограничения, один или несколько ферментов с активностью, соответствующей активности LIP2, LIP3, LIP4, LIP8, TGL1, LIP16, LIP17 или LIP18 Yarrowia, предпочтительно для модификации с целью подавления или устранения эндогенных генов, кодирующих ферменты с активностью, соответствующей активности LIP2 и/или LIP3 и/или LIP4 и/или LIP8 Yarrowia.

В настоящем изобретении ферменты, активность которых соответствует активности LIP Yarrowia, охватывают не только ферменты, происходящие из Yarrowia, например, Yarrowia lipolytica, например, LIP2, LIP3, LIP4, LIP8, TGL-1, LIP16, LIP17, LIP18 Yarrowia с последовательностями SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 либо их комбинации, но также и ферменты, обладающие эквивалентной ферментативной активностью, но происходящие из других организмов, в частности, из маслянистых клеток-хозяев, продуцирующих ретинилацетат. Предпочтительно клетка-хозяин содержит делецию активности эндогенной липазы, соответствующей активности липазы 2, 3, 4, 8 Yarrowia lipolytica либо их комбинациям, в частности, клетка-хозяин представляет собой

клетку *Yarrowia lipolytica*, содержащую делецию активности эндогенной липазы, соответствующей, например, активности Lip8 или активности комбинации Lip8, такой, как комбинация Lip8 с Lip2, комбинация Lip8 с Lip2 и Lip3 или комбинация Lip8 с Lip2, Lip3 и Lip4.

Введение мутаций в нуклеиновые кислоты или аминокислоты, т.е. мутагенез, может осуществляться различными способами, такими, к примеру, как случайный или направленный мутагенез, физическое повреждение, вызванное такими агентами, как, например, облучение, химическая обработка или вставка генетического элемента. Специалистам известно, как вводятся мутации.

Термины «идентичность последовательностей», «степень идентичности» применяются здесь взаимозаменяемо. Для настоящего изобретения установлено, что для определения степени идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух последовательностей нуклеиновой кислоты эти последовательности выравнивают для оптимального сравнения. Для оптимизации выравнивания двух последовательностей можно вводить пробелы в любые из двух сравниваемых последовательностей. Такое выравнивание может проводиться по всей длине сравниваемых последовательностей. С другой стороны, выравнивание может проводиться и по меньшей длине, к примеру, по 20, по 50, по 100 и более нуклеотидам или аминокислотам. Идентичность последовательностей означает процент идентичных совпадений между двумя последовательностями по данному совмещенному участку. Степень идентичности последовательностей между двумя аминокислотными последовательностями или между двумя нуклеотидными последовательностями можно определить при помощи алгоритма Needleman and Wunsch для выравнивания двух последовательностей (Needleman S.B. and Wunsch C.D. (1970) *J. Mol. Biol.* 48, 443-453). По этому алгоритму можно проводить сопоставление как аминокислотных, так и нуклеотидных последовательностей. Алгоритм Needleman-Wunsch реализован в компьютерной программе NEEDLE. Для настоящего изобретения использовалась программа NEEDLE из пакета EMBOSS (версия 2.8.0 или выше, EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000) Rice, Longden and Bleasby, *Trends in Genetics* 16 (6), pp. 276-277, <http://emboss.bioinformatics.nl/>). Для белковых последовательностей в качестве матрицы замен используется EBLOSUM62. Для нуклеотидных последовательностей используется EDNAFULL. Оптимальные параметры – штраф за открытие пробела 10 и штраф за расширение пробела 0,5. Специалистам должно быть понятно, что все эти различные параметры будут обеспечивать несколько разные результаты, но общая степень идентичности двух последовательностей существенно не изменится при использовании разных алгоритмов.

После выравнивания при помощи программы NEEDLE, как описано выше, рассчитывается степень идентичности последовательностей между искомой последовательностью и последовательностью по изобретению следующим образом: количество соответствующих положений на совмещенном участке, где находятся идентичные аминокислоты или идентичные нуклеотиды в обеих последовательностях, делится на общую длину участка за вычетом общего количества пробелов на этом участке. Определенная таким образом степень идентичности может быть получена на основе NEEDLE при помощи опции NOBRIEF и помечена в выходных данных программы как «наибольшая идентичность». Если обе сравниваемые аминокислотные последовательности не отличаются ни по одной аминокислоте, то они идентичны или степень их идентичность равна 100%.

Описанные здесь ферменты для экспрессии в подходящей клетке-хозяине, используемой в настоящем изобретении, также охватывают ферменты, имеющие (дальнейшие) аминокислотные замены, которые не изменяют их активность, т.е. проявляют такие же свойства, как и описанные здесь ферменты. Такие мутации, которые не изменяют (ферментативную) активность ферментов по настоящему изобретению, также называют «молчащими мутациями».

В настоящем изобретении предполагается, что названия организмов, например, микроорганизмов, грибов, водорослей или растений, также включают их синонимы или базонимы, обладающие такими же физиологическими свойствами, как это определено Международным кодексом номенклатуры прокариот либо Международным кодексом номенклатуры водорослей, грибов и растений (Мельбурнский кодекс). Так, например, штамм *Lachancea mirantina* является синонимом штамма *Zygosaccharomyces* sp. IFO 11066, полученного в Японии.

Настоящим изобретением предусмотрен способ получения ретинилацетата, в котором ретинилацетат образуется при ацетилировании ретинола (предпочтительно по меньшей мере 65% в виде *транс*-ретинола), как изложено здесь, под действием модифицированного/немодифицированного ATF, как описано здесь, причем ацетилирующие ферменты экспрессируются гетерологично в подходящей клетке-хозяине в подходящих условиях, как описано здесь, а клетку-хозяина культивируют в среде, содержащей эффективное количество этанола, добавляемого во время ферментации. Полученный ретинилацетат можно выделить и необязательно дополнительно очистить от среды и/или клетки-хозяина. Указанные ацетилированные ретиноиды, которые описаны здесь, можно использовать в качестве строительных блоков в многостадийном процессе, ведущем к получению витамина А. Витамин А можно выделить и необязательно

дополнительно очистить от среды и/или клетки-хозяина, как это известно в данной области.

В настоящем изобретении термин «удельная активность» или «активность» в отношении ферментов означает их каталитическую активность, т.е. способность катализировать образование продукта из данного субстрата. Удельная активность определяется как количество потребленного субстрата и/или произведенного продукта за данный промежуток времени в расчете на определенное количество белка при определенной температуре. Как правило, удельная активность выражается в мкмоль потребленного субстрата или образовавшегося продукта в минуту на мг белка. Обычно мкмоль/мин сокращается как U (= единица). Поэтому определения единицы удельной активности в мкмоль/мин/(мг белка) или в ед./мг(белка) применяются в данном описании взаимозаменяемо. Фермент является активным, если он осуществляет свою каталитическую активность *in vivo*, т.е. внутри клетки-хозяина, как определено здесь, или в подходящей (бесклеточной) системе в присутствии подходящего субстрата. Специалистам известно, как измеряется активность ферментов. В данной области известны аналитические методы оценки способности подходящего ATF (дикого типа или модифицированного), как определено здесь, к продукции ретинилацетата, т.е. к ацетилированию ретинола, или оценки ферментов с липазной активностью, как определено здесь, например, как описано в примере 4 из WO 2014/096992. Короче говоря, можно измерять титры таких продуктов, как ретинилацетат, ретинол, *транс*-ретиноль, *цис*-ретиноль, бета-каротин и т.п. методом HPLC.

Что касается подходящих клеток-хозяев, содержащих специфические ферменты, участвующие в биосинтезе бета-каротина, которые экспрессируются и активны *in vivo*, что ведет к получению каротиноидов, например, бета-каротина, то в данной области известны как гены, так и способы получения клеток-хозяев, продуцирующих каротиноиды, например, см. WO 2006/102342. В зависимости от продуцируемых каротиноидов могут быть задействованы различные гены.

В настоящем изобретении «продуцирующая ретинол клетка-хозяин» – это такая клетка, в которой экспрессируются и активны *in vivo* соответствующие полипептиды, что ведет к получению ретиноидов, например, витамина А и его предшественников, включая ретинол, посредством ферментативной активности ATF, как описано здесь. В данной области известны и гены пути витамина А, и способы получения клеток-хозяев, продуцирующих ретиноиды. Термин «ретиноид» включает ретинол, который используется в качестве субстрата для модифицированных ацетилирующих ферментов, как определено здесь. «Продуцирующая ретинилацетат клетка-хозяин» – это

соответствующая клетка, способная ацетилировать ретинол в ретинилацетат.

Ретиноиды в настоящем изобретении включают продукты расщепления бета-каротина, также известные как апокаротиноиды, включая, без ограничения, ретиналь, ретиноловую кислоту, ретинол, метоксид ретиноевой кислоты, ретинилацетат, сложные эфиры ретинила, 4-кеторетиноиды, 3-гидроксиретиноиды либо их комбинации. Биосинтез ретиноидов описан, например, в WO 2008/042338.

«Ретиналь» в настоящем изобретении известен под названием по IUPAC: (2E,4E,6E,8E)-3,7-диметил-9-(2,6,6-триметилциклогексен-1-ил)нона-2,4,6,8-тетраеналь.

При этом он взаимозаменяемо обозначается как ретинальдегид или альдегид витамина А и включает как *цис*-, так и *транс*-изоформы, такие, например, как 11-*цис*-ретиналь, 13-*цис*-ретиналь, *транс*-ретиналь и полностью *транс*-ретиналь.

Термин «каротиноиды», используемый здесь, хорошо известен в данной области. Он охватывает длинные сопряженные изопреноидные C₄₀-полиены, которые в природе образуются при лигировании двух молекул C₂₀-геранилгеранилпирофосфата. Они включают, без ограничения, фитоины, ликопины и каротины, такие, например, как бета-каротин, который может окисляться в 4-кето-положении или 3-гидрокси-положении с образованием кантаксантина, зеаксантина или астаксантина. Биосинтез каротиноидов описан, например, в WO 2006/102342.

«Витамин А» в настоящем изобретении может означать любую химическую форму витамина А, которая встречается в растворах, твердых веществах и составах и включает ретинол, ретинилацетат и сложные эфиры ретинила. Витамин А также включает ретиноевую кислоту, например, недиссоциированную в виде свободной кислоты или диссоциированную в виде аниона.

Также неожиданно было обнаружено, что образование и других происходящих из изопреноидов продуктов типа стевииоловых гликозидов улучшается при ферментации рекомбинантной грибной клетки-хозяина, особенно дрожжевой клетки, например, клетки *Saccharomyces cerevisiae*, более предпочтительно клетки маслянистых дрожжей, например, рекомбинантной клетки *Yarrowia* (модифицированной соответствующим образом для получения стевииоловых гликозидов) в присутствии этанола. Было обнаружено, что выход таких продуктов повышается при использовании этанола в качестве источника углерода, особенно в процессе периодической ферментации с подпиткой, по сравнению с соответствующим процессом в отсутствие этанола. В частности, выход таких продуктов повышается при использовании чистого этанольного сырья или смешанного этанольного сырья (например, смеси этанола и глюкозы) после периодической фазы культивирования.

Соответственно, настоящим изобретением предусмотрен способ получения стевиоловых гликозидов в рекомбинантной грибной клетке-хозяине, предпочтительно дрожжевой клетке, например, клетке *Saccharomyces cerevisiae*, более предпочтительно в клетке маслянистых дрожжей, например, рекомбинантной клетке *Yarrowia*, более предпочтительно *Yarrowia lipolytica* (модифицированной соответствующим образом для получения стевиоловых гликозидов), причем способ включает ферментацию в присутствии этанола, как определено здесь. Настоящим изобретением также предусмотрено применение клетки-хозяина, продуцирующей стевиоловые гликозиды, предпочтительно дрожжевой клетки, например, клетки *Saccharomyces cerevisiae*, более предпочтительно клетки маслянистых дрожжей, например, рекомбинантной клетки *Yarrowia*, более предпочтительно *Yarrowia lipolytica* (модифицированной соответствующим образом для получения стевиоловых гликозидов), в способе ферментации, включающем добавление этанола во время ферментации, как определено здесь.

Подходящие грибные клетки-хозяева для получения стевиоловых гликозидов известны в данной области и описаны, например, в заявках WO 2011/153378, WO 2013/022989, WO 2014/122227, WO 2013/110673 и WO 2015/007748.

Полученные стевиоловые гликозиды можно выделить и необязательно дополнительно очистить от среды и/или клеток-хозяев способом, известным специалистам в данной области.

Следующие примеры носят исключительно иллюстративный характер и не предназначены для ограничения объема изобретения. Содержание всех источников информации, патентных заявок, патентов и опубликованных патентных заявок, цитируемых в настоящем описании, включено в него посредством ссылок, в частности, это касается заявок WO 2019/058001, WO 2020/141168, WO 2008/042338, WO 2014/096992, WO 2006/102342, WO 2016/172282, WO 2011/153378, WO 2013/022989, WO 2014/122227, WO 2013/110673 и WO 2015/007748.

Примеры

Пример 1. Общие методы и плазмиды

Все основные процедуры молекулярной биологии и манипуляций с ДНК, описанные здесь, обычно выполнялись в соответствии с Sambrook et al. (eds.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York (1989); или Ausubel et al. (eds). *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley: New York (1998).

Трансформация ДНК. Трансформацию штаммов проводили при культивировании в течение ночи на чашках со средой YPD; соскабливали с чашки 50 мкл клеток и

трансформировали их путем инкубации в 500 мкл с 1 мкг трансформирующей ДНК, обычно линейной ДНК для интегративной трансформации, в 40% ПЭГ 3550, 100 мМ ацетата лития, 50 мМ дитиотреитола, 5 мМ трис-Cl, pH 8,0, 0,5 мМ ЭДТА в течение 60 минут при 40°C и высевали прямо на селективную среду или же, при отборе с маркером доминантного антибиотика клетки подращивали в жидкой среде YPD в течение 4 часов при 30°C, а затем высевали на селективную среду. Рециркуляцию маркера URA3 проводили с помощью 5-фтороротовой кислоты (FOA). От плазмид с эписомальным маркером устойчивости к гигромицину избавлялись путем пересева на неселективные среды с идентификацией Нуг-чувствительных колоний путем посева реплик колоний из неселективной среды на среду, содержащую гигромицин (100 мкг/мл).

Молекулярная биология ДНК. Плазмиды MB9523, содержащие системы экспрессии для DrBCO, LmATF-S480Q_G409A_V407I_H69A_I484L и FfRDH (SEQ ID NO:17), синтезировали на фирме GenScript (Piscataway, NJ, USA). Плазмида MB9523 содержит «URA3» для отбора по маркерам при трансформации *Yarrowia lipolytica*. Для вставки генов путем случайного негомологичного соединения концов гена и маркера выделяли представляющий интерес фрагмент плазмиды MB9523, расщепленной SfiI, методом гель-электрофореза и очищали на колонке Qiagen. Клоны проверяли секвенированием. Обычно гены синтезировали методами синтетической биологии на фирме GenScript (Piscataway, NJ).

Список плазмид. Использовали плазмиды, штаммы, нуклеотидные и аминокислотные последовательности, приведенные в таблицах 1 и 2 и в Перечне последовательностей. В целом, все немодифицированные последовательности, указанные здесь, являются такими же, как и последовательности, доступные в базе данных для эталонного штамма CLIB122 (Dujon B. et al., Nature 2004 Jul 1, 430(6995):35-44).

Таблица 1. Список плазмид, используемых при конструировании штаммов для гиперэкспрессии или делеции соответствующих генов, указанных как «вставка». «LmATF1-mut» – *Lachancea mirantina* (LmATF1; SEQ ID NO:13 в WO 2019/058001), несущая замены аминокислот S480Q_G409A_V407I_H69A_I484L. «DrBCO» означает BCO из *Danio rerio* (см. SEQ ID NO:16 в WO 2020/141168); «FfRDH» означает RDH из *Fusarium fujikuroi* (см. SEQ ID NO:22 в WO 2020/141168). См. дальнейшие пояснения в тексте.

Плазмида	Вставка	Маркер	SEQ ID NO:
MB9523	DrBCO; LmATF1-mut; FfRDH	URA3	17

Таблица 2. Список используемых штаммов *Yarrowia lipolytica*. Конструкция ML17 544 описана в таблице 2 WO 2020/141168. См. дальнейшие подробности в тексте.

Штамм	Описание
ML18812	ML17544, трансформированный с помощью MB9523

Условия ферментации. Периодическая ферментация с подпиткой была идентична описанным ранее условиям, за исключением использования Drakeol 5 (Penreco, Karns City, PA, США) или другого верхнего слоя и резервуара с мешалкой, из которого подавали кукурузное масло, глюкозу или этанол в настольный реактор общим объемом от 0,5 до 5 л (см. WO 2016/172282). Состав источника углерода в среде загрузки и в среде подпитки приведен в таблице 3. Подпитку начинали после израсходования углерода в исходной порции, при этом её проводили контролируемым образом для поддержания заданного уровня растворенного кислорода (PK).

Вкратце, ферментацию проводили в стеклянных ферментационных системах New Brunswick или Eppendorf общим объемом 3,0 л. В ферментер загружали следующие компоненты: 2228 мл деионизированной воды, 10,46 мл раствора, содержащего 1,96 г/кг $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ и 0,20 г/кг NaCl, 1,04 г $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 26,18 г $(NH_4)_2SO_4$, 27,10 г KH_2PO_4 , 19,62 г дрожжевого экстракта Tastone (Marcor, Leominster, MA), 26 мл пеногасителя DF204, 0,654 мкл тиамина·HCl при 4 мг/мл, 3,27 мл/л исходного раствора микроэлементов, содержащего: 200 г/кг лимонной кислоты, 27,3 г/кг $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 19,6 г/кг $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 18,7 г/кг $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 4,9 г/кг H_3BO_3 , 21,9 г/кг $MnSO_4 \cdot H_2O$, 30,2 г/кг $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, и автоклавировали. После охлаждения добавляли источник углерода вместе с 800 мл Drakeol 5 или иной второй фазы. Ферментационную среду инокулировали ночными культурами по 200 мл в среде YP при культивировании в колбах на качалке при 250 об/мин при 30°C и с определенными источниками углерода, приведенными в таблице 3. Параметры ферментации: перемешивание при 1000 об/мин, подача воздуха по 4,6 л/мин для этанола и 2,3 л/мин для масла и смеси жирных кислот, поддержание pH 5,5 с помощью NH_4OH и температуры на уровне 30°C. В начале подпитки её подавали так, чтобы поддерживался заданный уровень PK 40%. Уровень PK линейно снижался до 20% на протяжении следующих 24 часов за счет увеличения скорости подачи. Затем PK поддерживали на уровне 20% путем подачи подпитки на протяжении всей оставшейся части ферментации.

Таблица 3. Протокол подпитки при ферментации. Вторая фаза при ферментации всегда составляла ~20% Drakeol 5 по массе. См. дальнейшие пояснения в тексте.

Рабочий цикл	Загрузка (исходная порция)	Подпитка
Этанол	5% глюкозы (вес/об) 1% этанола (вес/об)	100% этанол (вес/об)
Масло	6,25% олеиновой кислоты (об/об) 1,4% кукурузного масла (об/об)	100% кукурузное масло (вес/об)

Количественный анализ ретиноидов. Анализ ретиноидов проводили методами обратно-фазовой хроматографии C4 (см. ниже) и C18, как описано в WO 2020/141168. Суммирование всех промежуточных продуктов дает общее количество ретиноидов.

Обратно-фазовая хроматография C4. Для точного определения отдельных ретиноидов использовали долговременную обратно-фазовую систему. Авторы разделяли анализируемые вещества при 230 нм и 325 нм на установке Agilent 1290 с колонкой 150×3,0 мм с неподвижной фазой в 3 мкм YMC Pro C4 (YMC America, Devens, MA) и с инжекторной петлей 5 мкл, причем колонку и лоток для проб контролировали при 23°C с градиентами, описанными в таблице 4В. Анализируемые вещества детектировали при 230 нм и 325 нм, а идентичность пиков проверяли методом LCMS. Анализируемые вещества разделялись в виде дискретных пиков, которые соотносились в соответствии с таблицей 4А.

Таблица 4А. Список анализируемых веществ при использовании обратно-фазового метода C4. Суммирование всех промежуточных продуктов дает общее количество ретиноидов. «RT» означает время удержания. См. дальнейшие подробности в тексте.

Промежуточные продукты	RT (мин)	λ_{\max} (нм)
Транс-ретинол	20,21	325
Цис-ретинол	20,32	325
Дигидроретинол	20,75	290
Транс-ретиноль	20,89	380
Цис-ретиноль	21,02	380
Транс-ретинилацетат	22,15	325
Цис-ретинилацетат	22,35	325
Дигидроретинилацетат	22,60	290
Ретиниловые эфиры	26,30	325

Таблица 4В. Градиенты в методе UPLC, где растворитель А: ацетонитрил; растворитель В: вода; растворитель С: вода/ацетонитрил/метансульфоновая кислота = 1000:25:1. См. дальнейшие подробности в тексте.

Время (мин)	%А	%В	%С	Подача (мл/мин)
0	5	85	10	0,5
20	98	0	2	0,5
35	98	0	2	0,5
35,1	5	85	10	0,5
40	5	85	10	0,5

Калибровка метода. Метод калибровали с использованием ретинилацетата высокой чистоты, полученного от DSM Nutritional Products, Kaiseraugst, CH. Ретинолы и ретиналь определяли относительно ретинилацетата. Готовили разведения следующим образом. Делали навеску 40 мг ретинилацетата в мерной колбе на 100 мл и растворяли в этаноле, получая раствор в 400 мкг/мл. Этот раствор обрабатывали ультразвуком по мере необходимости, чтобы обеспечить растворение. 5 мл этого раствора в 400 мкг/мл разбавляли до 50 мл (разведение 1/10, конечная концентрация 40 мкг/мл), 5 мл до 100 мл (разведение 1/20, конечная концентрация 20 мкг/мл), 5 мл раствора в 40 мкг/мл до 50 мл (разведение 1/10, конечная концентрация 4 мкг/мл), 5 мл раствора в 20 мкг/мл до 50 мл (разведение 1/10, 2 мкг/мл), используя смесь 50/50 метанол/метил-трет-бутиловый эфир (МТБЕ) в качестве разбавителя. Все разведения делали в мерных колбах. Чистоту ретинилацетата определяли путем дальнейшего разведения исходного раствора 400 мкг/мл в 100 раз (с помощью мерной пипетки на 2 мл и мерной колбы на 200 мл) в этаноле. Поглощение этого раствора при 325 нм с использованием этанола принимали в качестве холостой пробы с корректировкой исходной концентрации по уравнению ($Abs \times \text{разведение} (100) \times \text{молекулярный вес} (328,5)/51180 = \text{концентрация в мг/мл}$). Из-за быстрого смещения максимума УФ-поглощения ретинилацетата лучше использовать низкие концентрации.

Подготовка образцов. Образцы верхнего слоя второй фазы от каждого штамма разбавляли в 25 раз или больше, если нужно, в тетрагидрофуране (THF). Образцы цельного бульона при ферментации готовили в пробирках Precellys на 2 мл (Bertin Corp, Rockville, MD), добавляя 25 мкл хорошо перемешанного бульона и 975 мкл THF. Пробирки центрифугировали ($3 \times 15 \times 7500$ об/мин) двумя циклами с замораживанием при -80°C на 10 минут между циклами. Остатки клеток осаждали центрифугированием на 1 минуту при 13 000 об/мин. Эти образцы разбавляли THF в 10 раз для анализа.

Пример 2. Влияние источника углерода на образование ретиноидов при периодической ферментации с подпиткой с использованием *Yarrowia*

Для оценки влияния источника углерода на образование ретиноидов у *Yarrowia lipolytica* проводили ферментацию в присутствии этанола или масла (см. таблицу 3) и определяли чистоту и содержание ретинилацетата по измерению содержания FARE у штамма ML18812.

Ферментация в присутствии этанола приводила к сильному снижению образования FARE по сравнению с ферментацией в присутствии кукурузного масла. Общее содержание ретиноидов, а также ретинилацетата также повышалось по сравнению с ферментацией кукурузного масла. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5. Влияние этанола на продукцию FARE, ретиноидов и ретинилацетата («retAc») при использовании штамма ML18812. «+++» – попадает в верхний квартиль максимальных значений, «++» – в средний квартиль, «+/-» – следовые количества, а «---» – не наблюдается, «retAc» означает ретинилацетат. См. дальнейшие пояснения в тексте.

Источник углерода	Всего ретиноидов	retAc	FARE
Этанол	+++	+++	---
Кукурузное масло	++	+/-	+++

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения ретинилацетата в грибной клетке-хозяине, предпочтительно в клетке маслянистых дрожжей, предпочтительно *Yarrowia*, который включает ферментацию клетки-хозяина в присутствии этанола.

2. Способ по п. 1, в котором ферментация представляет собой периодическую ферментацию с подпиткой.

3. Способ по п. 2, включающий добавление этанола в среду культивирования в концентрации 5% или меньше (по объему) во время периодической фазы.

4. Способ по любому из пп. 1-3, включающий ферментацию клетки-хозяина в отсутствие триглицеридов, предпочтительно растительного масла.

5. Способ по любому из пп. 1-4, при котором снижается или устраняется образование побочных продуктов, включая ретиниловые эфиры жирных кислот (FARE), предпочтительно снижается по меньшей мере на 50% в пересчете на общее количество ретиноидов по сравнению со способом, включающим ферментацию клетки-хозяина в отсутствие этанола.

6. Способ по любому из пп. 1-5, при котором повышается содержание ретинилацетата в пересчете на общее количество ретиноидов, предпочтительно по меньшей мере на 25% по сравнению со способом, включающим ферментацию клетки-хозяина в отсутствие этанола.

7. Способ по любому из пп. 1-6, при котором повышается общая продукция ретиноидов, предпочтительно по меньшей мере на 30% по сравнению со способом, включающим ферментацию клетки-хозяина в отсутствие этанола.

8. Способ по любому из пп. 1-7, в котором клетку-хозяин трансформируют и в ней экспрессируются гетерологичные гены, предпочтительно гены, кодирующие ацетилирующие ферменты, катализирующие превращение ретинола в ретинилацетат, более предпочтительно ферменты гриба, наиболее предпочтительно происходящие из *Lachancea mirantina*.

9. Способ по п. 8, в котором ацетилирующий фермент содержит одну или несколько замен аминокислот в последовательности, которая по меньшей мере на 20%, например, на 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 97, 98, 99% и вплоть до 100% идентична SEQ ID NO: 18, причем указанные одна или несколько замен аминокислот локализованы в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам, выбранным из группы, состоящей из положений 68, 69, 72, 73, 171, 174, 176, 178, 291, 292, 294, 301, 307, 308, 311, 312, 320, 322, 334, 362, 405, 407, 409, 480, 483, 484, 490, 492, 520, 521, 522, 524, 525, 526 и их комбинаций в полипептиде, имеющем последовательность

SEQ ID NO: 18.

10. Способ снижения ферментативного превращения ретинола в FARE, при этом предпочтительно содержание FARE в пересчете на общее количество ретиноидов составляет менее 25%, причем данный способ включает ферментацию продуцирующей ретинилацетат клетки-хозяина в присутствии этанола.