(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 033724 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.11.20

(21) Номер заявки
201500659

(22) Дата подачи заявки
2013.08.28

(51) Int. Cl. ***C12N 9/10*** (2006.01)
C12N 15/54 (2006.01)
C12P 23/00 (2006.01)

(54) ТРАНСФОРМИРОВАННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ, ОБЛАДАЮЩИЕ АЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ И СПОСОБНЫЕ ПРОДУЦИРОВАТЬ АЦЕТИЛИРОВАННЫЕ КАРОТИНОИДЫ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **12198373.8; 61/830,234**
(32) **2012.12.20; 2013.06.03**
(33) **EP; US**
(43) **2015.12.30**
(86) **PCT/IB2013/058049**
(87) **WO 2014/096992 2014.06.26**

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

(72) Изобретатель:
Фаррел Кристофер, Хьюстон Питер, Лапраде Лиза, Балч Натали, Мэйорга Мария (US)

(74) Представитель:
Бадаева Т.Н., Фелицына С.Б. (RU)

(56) DATABASE UniProt [Online] 5 April 2011 (2011-04-05), "SubName: Full=Atflp", XP002717048, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:E7KIN6 Database accession no. E7KIN6 sequence

T. Fujii ET AL.: "Molecular cloning, sequence analysis and expression of the yeast alcohol acetyltransferase gene", Appl. Environ. Microbiol, 1 January 1994 (1994-01-01), page 2786, XP055090551, Retrieved from the Internet: URL:http://aem.asm.org/content/60/8/2786.full.pdf [retrieved on 2013-11-27] figure 3

EP-A2-0574941

WO-A2-02099095

DATABASE UniProt [Online] 5 April 2011 (2011-04-05), "SubName: Full=Atf1p; MRQMYRYGAN VGFIDFTPWI SEFDMNDNKE NFWPLIEHYH EVISEALRNK KHLHGLGFNI", XP002719365, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:E7QL60 Database accession no. E7QL60 sequence

WO-A2-2009037329

Toshio Fujii: "Yeast Sequencing Reports Nucleotide Sequences of Alcohol Acetyltransferase Genes from Lager Brewing Yeast, Saccharomyces carlsbergensis", YEAST VOL, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 593-598, XP055098624, Retrieved from the Internet: URL:http://onlinelibrary.wiley.com/store/1 0.1002/(SICI)1097-0061(199605)12:6<593::AID-YEA593>3.0.C0; 2-B/asset/593_ftp.pdf?v=1&t=hqxtv69s&s=253ddba113edc75277fb810cc2a530be7ae5d53c [retrieved on 2014-01-27] figures 1, 2

DATABASE UniProt [Online] 31 October 2012 (2012-10-31), "SubName: Full=ATF1-like protein", XP002719366, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:J4U1K1 Database accession no. J4U1K1 sequence

DATABASE UniProt [Online] 31 October 2012 (2012-10-31), "SubName: Full=Atf1p", XP002719367, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:J8Q1N7 Database accession no. J8Q1N7 sequence

(57) Изобретение относится к трансформированным микроорганизмам, в которых экспрессирован по меньшей мере один гетерологичный полипептид с ацетилтрасферазной активностью, которая обеспечивает превращение молекулы каротиноида в частично или полностью ацетилированную молекулу каротиноида. Также изобретение относится к применению заявленных трансформированных микроорганизмов для производства ацетилированных каротиноидов.

033724 B1

033724 B1

Уровень техники

Настоящее изобретение касается новых ацетилтрансфераз, последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих данные ацетилтрансферазы, экспрессионных конструкций и векторов, содержащих данные последовательности, микроорганизмов, трансформированных ими, и способов микробиологического получения каротиноидов, например, таких как зеаксантин, астаксантин, лютеин или β-криптоксантин.

Каротиноиды представляют собой органические пигменты, окрашенные в цвета от желтого до красного, которые в природе продуцируются некоторыми организмами, включая фотосинтезирующие организмы (например, растения, водоросли, цианобактерии) и некоторые грибы.

Каротиноиды, такие как лютеин, зеаксантин или астаксантин, являются важными добавками в рационе человека и сельскохозяйственных животных в качестве пигментных веществ и предшественников производных витамина А. Кроме того, каротиноиды обладают полезным для здоровья действием, таким как усиление иммунного ответа, и благодаря их антиоксидантным свойствам противораковым действием, что делает интересным их применение в качестве нутрицевтиков (биологически активных добавок). Таким образом, экономичный способ получения каротиноидов и продуктов с повышенным содержанием каротиноидов имеет большое значение. В частности, экономичными способами получения каротиноидов являются биотехнологические процессы, в которых используются белки и гены биосинтеза каротиноидов из организмов, продуцирующих каротиноиды.

Раскрытие изобретения

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что введение гена, кодирующего ацетилтрансферазу последовательности SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 14 в клетку-хозяина, такую как Yarrowia lipolytica или Paracoccus zeaxanthinifacien, которая способна продуцировать определенный каротиноид, содержащий по меньшей мер, одну гидроксильную группу, как, например, зеаксантин или астаксантин, изменяет профили каротиноидов в клетках-хозяевах таким образом, что продуцируются ацетилированные формы каротиноида, что обеспечивает повышенное/улучшенное накопление в клетке каротиноидных соединений (ацетилированных плюс неацетилированных форм) по сравнению с нетрансформированными штаммами.

Таким образом, настоящее изобретение касается трансформированного микроорганизма Yarrowia lipolytica или Paracoccus zeaxanthinifaciens, способного продуцировать ацетилированные каротиноиды, где трансформация предусматривает введение нуклеиновой кислоты или конструкции нуклеиновой кислоты, включающей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 13. Указанные нуклеиновые кислоты кодируют полипептид с ацетилтрансферазной активностью последовательности SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 14, который обеспечивает превращение молекулы каротиноида, содержащей (a) по меньшей мере одно β-иононное кольцо по меньшей мере с одной связанной с кольцом гидроксильной группой, или (b) по меньшей мере одно ε-иононное кольцо по меньшей мере с одной связанной с кольцом гидроксильной группой, или (c) по меньшей мере одно β-иононное кольцо по меньшей мере с одной связанной с кольцом гидроксильной группой и по меньшей мере одно ε-иононное кольцо по меньшей мере с одной связанной с кольцом гидроксильной группой, в соответствующую частично или полностью ацетилированную молекулу каротиноида.

Настоящее изобретение также предусматривает применение трансформированного микроорганизма по настоящему изобретению для производства ацетилированных каротиноидов.

Обзор перечня последовательностей.

SEQ ID NO: 1 представляет собой неоптимизированную последовательность ДНК, кодирующую ацетилтрансферазу AYF1 из S.cerevisiae.

SEQ ID NO: 2 представляет собой неоптимизированную последовательность ДНК, кодирующую ацетилтрансферазу AYF1из S.bayanus.

SEQ ID NO: 3 представляет собой неоптимизированную последовательность ДНК, кодирующую ацетилтрансферазу AYF1из S.mikatae.

SEQ ID NO: 4 представляет собой неоптимизированную последовательность ДНК, кодирующую ацетилтрансферазу AYF1 из S.kudriavzevii.

SEQ ID NO: 5 представляет собой аминокислотную последовательность, выведенную из SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 6 представляет собой аминокислотную последовательность, выведенную из SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 7 представляет собой аминокислотную последовательность, выведенную из SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 8 представляет собой аминокислотную последовательность, выведенную из SEQ ID NO: 4.

SEQ ID NO: 9 представляет собой последовательность ДНК, кодирующую ацетилтрансферазу ATF1 из S.cerevisiae, оптимизированную для экспрессии в Yarrowia lipolytica.

SEQ ID NO: 10 представляет собой последовательность ДНК, кодирующую ацетилтрансферазу

ATF1 из S.bayanus, оптимизированную для экспрессии в Yarrowia lipolytica.

SEQ ID NO: 11 представляет собой последовательность ДНК, кодирующую ацетилтрансферазу ATF1 из S.mikatae, оптимизированную для экспрессии в Yarrowia lipolytica.

SEQ ID NO: 12 представляет собой последовательность ДНК, кодирующую ацетилтрансферазу ATF1 из S. kudriavzevii, оптимизированную для экспрессии в Yarrowia lipolytica.

SEQ ID NO: 13 представляет собой неоптимизированную последовательность ДНК, кодирующую ацетилтрансферазу ATF1 из S.arboricolus.

SEQ ID NO: 14 представляет собой аминокислотную последовательность, выведенную из SEQ ID NO: 13.

SEQ ID NO: 15 представляет собой последовательность ДНК, кодирующую ацетилтрансферазу ATF1 из S.arboricolus, оптимизированную для экспрессии в Yarrowia lipolytica.

SEQ ID NO: 16 представляет собой последовательность ДНК, кодирующую ацетилтрансферазу ATF1 из S.bayanus, оптимизированную для экспрессии в Paracoccus zeaxanthinifaciens с помощью таблицы использования кодонов P.denitrificans PD1222.

SEQ ID NO: 17 представляет собой последовательность ДНК, кодирующую ацетилтрансферазу ATF1 из S.cerevisiae, оптимизированную для экспрессии в Paracoccus zeaxanthinifaciens с помощью таблицы использования кодонов P.denitrificans PD1222.

SEQ ID NO: 18: представляет собой неоптимизированную последовательность ДНК ацетилтрансферазы AYF1 из S.cerevisiae с удаленным внутренним сайтом NdeI.

Определения

Термин "изолированный полипептид" означает полипептид, который изменен человеком относительно данного полипептида, встречающегося в природе. В одном аспекте данный полипептид имеет чистоту по меньшей мере 1%, например, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 80% и по меньшей мере 90%, как установлено с помощью ЭФ в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия.

Термин "практически чистый полипептид" означает препарат, который содержит не более чем 10%, не более чем 8%, не более чем 6%, не более чем 5%, не более чем 4%, не более чем 3%, не более чем 2%, не более чем 1%, и не более чем 0,5 вес.% другого полипептидного материала, с которым он ассоциирован в природе или благодаря рекомбинантному получению. Предпочтительно полипептид имеет чистоту по меньшей мере 92%, например, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% и 100 вес.% от общего полипептидного материала, присутствующего в препарате. Полипептиды настоящего изобретения предпочтительно находятся в практически чистой форме. Это может быть достигнуто, например, путем выделения полипептида с помощью хорошо известных рекомбинантных методов или классических методов очистки.

Идентичность последовательности: родство между двумя аминокислотными последовательностями или между двумя нуклеотидными последовательностями описывается параметром "идентичность последовательности".

Для целей настоящего изобретения степень идентичности последовательности между двумя аминокислотными последовательностями определяется с применением алгоритма Нидлмана-Вунша (Needleman-Wunsch algorithm (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol., 48: 443-453)), который реализован в программе Needle пакета EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet., 16:276-277), предпочтительно версии 3.0.0 или более поздней версии. Необязательно используемыми параметрами являются штраф за открытие гепа в размере 10, штраф за продолжение гепа в размере 0,5 и матрица замен EBLOSUM62 (EMBOSS версия BLOSUM62). Выходная информация Needle, отмеченная надписью "longest identity" (полученная с использованием опции - nobrief), используется как процент идентичности и рассчитывается следующим образом:

(идентичные остатки×100)/(длина выравнивания - общее количество пробелов в выравнивании).

Для целей настоящего изобретения степень идентичности последовательности между двумя дезоксирибонуклеотидными последовательностями определяется с использованием алгоритма Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, 1970, supra), который реализован в программе Needle пакета EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, supra), предпочтительно версии 3.0.0 или более поздней версии. Необязательно используемыми параметрами являются штраф за открытие гепа в размере 10, штраф за продолжение гепа в размере 0,5 и матрица замен EDNAFULL (EMBOSS версия NCBI NUC4.4). Выходная информация Needle, отмеченная надписью "longest identity" (полученная с использованием опции - nobrief), используется как процент идентичности и рассчитывается следующим образом:

(идентичные дезоксирибонуклеотиды×100)/(длина выравнивания-общее количество пробелов в выравнивании).

Термин "фрагмент" означает полипептид, получаемый путем удаления одной или более (нескольких) аминокислот от амино- и/или карбоксильного конца зрелого полипептида; где данный фрагмент обладает ацетилтрансферазной активностью.

Термин "аллельный вариант" означает любую из двух или более альтернативных форм гена, занимающих один и тот же хромосомный локус. Аллельная вариация возникает естественным образом в результате мутации, и может приводить к полиморфизму в популяциях. Генные мутации могут быть молчащими (без изменений в кодируемом полипептиде) или могут кодировать полипептиды, имеющие измененные аминокислотные последовательности. Аллельный вариант полипептида представляет собой полипептид, кодируемый аллельным вариантом гена.

Термин "изолированный полинуклеотид" означает полинуклеотид, который изменен человеком относительно данного полинуклеотида, встречающегося в природе. В одном аспекте данный изолированный полинуклеотид имеет чистоту по меньшей мере 1%, например, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% и по меньшей мере 95%, как определено электрофорезом в агарозном геле. Полинуклеотиды могут быть геномного, кДНК, РНК, полусинтетического, синтетического происхождения или представлять собой любые их комбинации.

Термин "практически чистый полинуклеотид" означает препарат полинуклеотида, свободный от других посторонних или нежелательных нуклеотидов и находящийся в форме, пригодной для использования в генно-инженерных системах продукции полипептидов. Таким образом, практически чистый полинуклеотид содержит не более чем 10%, не более чем 8%, не более чем 6%, не более чем 5%, не более чем 4%, не более чем 3%, не более чем 2%, не более чем 1% и не более чем 0,5 вес.% другого полинуклеотидного материала, с которым он ассоциирован в природе или благодаря рекомбинантному получению. Практически чистый полинуклеотид может, однако, содержать природные 5'- и 3'-нетранслируемые участки, такие как промоторы и терминаторы. Предпочтительно полинуклеотид имеет чистоту по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% и по меньшей мере 99,5 вес.%. Полинуклеотиды настоящего изобретения предпочтительно находятся в практически чистой форме.

Термин "кодирующая последовательность" означает полинуклеотид, который непосредственно определяет аминокислотную последовательность полипептида. Границы кодирующей последовательности, как правило, определяются открытой рамкой считывания, которая обычно начинается со стартового кодона ATG или с альтернативных стартовых кодонов, таких как GTG и TTG, и заканчивается стоп-кодоном, таким как TAA, TAG и TGA. Кодирующая последовательность может представлять собой ДНК, кДНК, синтетический или рекомбинантный полинуклеотид.

Термин "кДНК" означает молекулу ДНК, которая может быть получена путем обратной транскрипции из зрелой прошедшей сплайсинг молекулы мРНК, полученной из эукариотической клетки. кДНК не содержит последовательностей интронов, которые могут присутствовать в соответствующей геномной ДНК. Исходный первичный РНК-транскрипт представляет собой предшественник мРНК, который процессируется, проходя ряд стадий, в том числе сплайсинга, прежде чем стать зрелой прошедшей сплайсинг мРНК.

Термин "конструкция нуклеиновой кислоты" означает молекулу нуклеиновой кислоты, либо одно-, либо двухцепочечную, которая получена из природного гена или является модифицированной для того, чтобы включать сегменты нуклеиновых кислот в таком порядке, который не встречается в природе, или которая является синтетической. Термин "конструкция нуклеиновой кислоты" является синонимом термина "экспрессионная кассета", когда конструкция нуклеиновой кислоты содержит контрольные (регуляторные) последовательности, необходимые для экспрессии кодирующей последовательности настоящего изобретения.

Термин "контрольные последовательности" означает все компоненты, необходимые для экспрессии полинуклеотида, кодирующего полипептид настоящего изобретения. Каждая контрольная последовательность может быть нативной или чужеродной по отношению к полинуклеотиду, кодирующему данный полипептид, или нативной или чужеродной по отношению к другим контрольным последовательностям. Такие контрольные последовательности включают, но ими не ограничиваются, лидерную последовательность, последовательность полиаденилирования, пропептидную последовательность, промотор, последовательность сигнального пептида и терминатор транскрипции. Как минимум, контрольные последовательности включают промотор и сигналы остановки транскрипции и трансляции. Контрольные последовательности могут быть предоставлены с линкерами с целью введения специфических сайтов рестрикции, облегчающих лигирование контрольных последовательностей с кодирующей областью полинуклеотида, кодирующего полипептид.

Термин "функционально связанный" означает конфигурацию, в которой контрольная последовательность находится в соответствующем положении по отношению к кодирующей последовательности полинуклеотида, так что контрольная последовательность управляет экспрессией данной кодирующей последовательности.

Термин "экспрессия" включает любую стадию, вовлеченную в продукцию полипептида, включая, но ими не ограничиваясь, транскрипцию, посттранскрипционную модификацию, трансляцию, посттрансляционную модификацию и секрецию.

Термин "экспрессионный вектор" означает линейную или кольцевую молекулу ДНК, которая включает полинуклеотид, кодирующий полипептид и функционально связанный с дополнительными нуклеотидами, которые обеспечивают его экспрессию.

Термин "клетка-хозяин" означает любой тип клеток, которые восприимчивы к трансформации, трансфекции, трансдукции, конъюгации и т.п. конструкцией нуклеиновой кислоты или экспрессионным вектором, содержащими полинуклеотид настоящего изобретения. Термин "клетка-хозяин" включает любое потомство родительской клетки, которое не идентично родительской клетке вследствие мутаций, которые происходят во время репликации.

Термин "вариант" означает полипептид, обладающий ацетилтрансферазной активностью, включающий изменения, то есть замену, вставку и/или делецию одного или более (нескольких) аминокислотных остатков в одном или более (в нескольких) положениях. Замена означает замену аминокислоты, занимающей определенное положение, другой аминокислотой; делеция означает удаление аминокислоты, занимающей определенное положение; и вставка означает встраивание (добавление) 1-3 аминокислот рядом с аминокислотой, занимающей определенное положение.

Осуществление изобретения

Ацетилтрансферазы далее в тексте означают белки или ферменты согласно настоящему изобретению, которые переносят ацетильную группу на каротиноид или производное каротиноида, содержащие по меньшей мере одну гидроксильную группу, например на зеаксантин или астаксантин, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 14 или последовательность, полученную из этих последовательностей путем замены, вставки или делеции аминокислот и имеющую гомологию по меньшей мере 50% на уровне аминокислот с последовательностью SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 14.

Аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 5, представляет собой результат трансляции последовательности кДНК, приведенной в SEQ ID NO: 1, аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 6, представляет собой результат трансляции последовательности кДНК, приведенной в SEQ ID NO: 2, аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 7, представляет собой результат трансляции последовательности кДНК, приведенной в SEQ ID NO: 3, аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 8 представляет собой результат трансляции последовательности кДНК, приведенной в SEQ ID NO: 4, и аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 14 представляет собой результат трансляции последовательности кДНК, приведенной в SEQ ID NO: 13.

Замена означает замену одной или нескольких аминокислот одной или несколькими аминокислотами. Заменами предпочтительно являются те замены, которые называются консервативными, при которых пришедшая на замену аминокислота имеет аналогичные свойства с исходной аминокислотой, например замена Glu на Asp, Gln на Asn, Val на Ile, Leu на Ile, Ser на Thr.

Делеция представляет собой замену аминокислоты на прямую связь. Предпочтительными положениями для делеций являются концы полипептида и линкерные участки между отдельными белковыми доменами.

Вставки представляют собой введение аминокислот в полипептидную цепь, они формально являются заменами прямой связи на одну или более аминокислот.

Гомология между двумя белками означает идентичность аминокислот по всей длине каждого белка, которая рассчитывается путем сравнения с помощью компьютерной программы GAP (UWGCG, University of Wisconsin, Genetic Computer Group, program algorithm of Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 1970, 48: 443-453), со следующими заданными параметрами:

штраф за открытие пробела 12,

штраф за удлинение пробела 4,

среднее совпадение 2,912,

среднее несовпадение -2,003.

Белок, который имеет гомологию по меньшей мере 50% на уровне аминокислот с последовательностью SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 14, означает белок, который при сравнении его последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 14 с использованием вышеуказанного программного алгоритма с указанным выше набором параметров имеет идентичность по меньшей мере 50%, предпочтительно 60%, особенно предпочтительно 70%.

Ацетилтрансферазы могут быть получены, как описано ниже, с помощью генной экспрессии соответствующих нуклеиновых кислот, которые кодируют эти белки из природных или генетически измененных организмов.

Кроме того, настоящее изобретение касается способа для переноса ацетильной группы на каротиноид или производное каротиноида, содержащий по меньшей мере одну гидроксильную группу, такую как, например, зеаксантин, бета-криптоксантин, 3'-гидроксиэхиненон, 3-гидроксиэхиненон, адониксантин (4-кетозеаксантин), астаксантин, феникоксантин (адонирубин), альфа-криптоксантин или лютеин или их производные, имеющие до 40 атомов углерода. Предпочтительно такие каротиноиды или произ-

водные каротиноидов содержат в молекуле по меньшей мере один 3-гидрокси-бета-иононный, или по меньшей мере один 3-гидрокси-4-кето-бета-иононный, или по меньшей мере один 3-гидрокси-эпсилон-иононный, или по меньшей мере один 3-гидрокси-4-кето-эпсилон-иононный структурный элемент, такие как, например, 3-гидрокси-6-винил-бета-ионон, 3-гидрокси-4-кето-6-винил-бета-ионон, 3-гидроксиретинол, 3-гидрокси-4-кеторетинол, 3-гидроксиретиналь, 3-гидрокси-4-кеторетиналь, 3-гидроксиретиноевая кислота, 3-гидрокси-4-кеторетиноевая кислота или лютеин.

Настоящее изобретение также касается последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих одну из ацетилтрансфераз согласно настоящему изобретению.

Предпочтительная нуклеиновая кислота имеет последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 13.

Более того, настоящее изобретение касается функциональных аналогов нуклеиновых кислот, соответствующих последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 13, которые получены путем добавления, замены, вставки и/или делеции отдельных или нескольких нуклеотидов, которые кодируют ацетилтрансферазу с требуемой специфичностью.

Изобретение также охватывает такие последовательности нуклеиновых кислот, которые содержат так называемые молчащие мутации или которые являются модифицированными по сравнению с конкретно указанной последовательностью в плане использования кодонов специфического происхождения или организма-хозяина, и встречающиеся в природе варианты таких последовательностей нуклеиновых кислот.

Настоящее изобретение также охватывает модификации последовательностей нуклеиновых кислот, полученные с учетом вырожденности генетического кода (т.е. без каких-либо изменений в соответствующей аминокислотной последовательности) или консервативной нуклеотидной замены (т.е. соответствующая аминокислота заменена другой аминокислотой такого же заряда, размера, полярности и/или растворимости), и последовательности, модифицированные путем добавления нуклеотидов, вставки, инверсии или делеции, где данные последовательности кодируют ацетилтрансферазу согласно настоящему изобретению, имеющую "измененный субстратный профиль", и соответствующие комплементарные последовательности.

Кроме того, настоящее изобретение касается экспрессионных конструкций, содержащих последовательность нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, под генетическим контролем регуляторных последовательностей нуклеиновой кислоты; и векторов, содержащих по меньшей мере одну из этих экспрессионных конструкций.

Настоящее изобретение также касается рекомбинантной молекулы нуклеиновой кислоты. "Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты" в первую очередь обозначает молекулу нуклеиновой кислоты или последовательность нуклеиновой кислоты, включающую молекулы нуклеиновой кислоты из двух или более различных генетических источников. Согласно настоящему изобретению рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой экспрессионную конструкцию, т.е. последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, обладающий ацетилтрансферазной активностью согласно настоящему изобретению, функционально связанную с последовательностью, контролирующей экспрессию, или же данная последовательность нуклеиновой кислоты может быть интегрирована в хромосому хозяина.

Предпочтительно конструкции согласно настоящему изобретению включают промотор в 5'-положении по отношению к интересующей кодирующей последовательности и последовательность терминатора в 3'-положении, и, необязательно, другие обычные регуляторные элементы, и в каждом случае функционально связанные с кодирующей последовательностью. Функциональную связь следует понимать в том смысле, что последовательное расположение промотора, кодирующей последовательности, терминатора и при необходимости других регуляторных элементов организовано таким образом, что каждый из регуляторных элементов может выполнять свою функцию в отношении экспрессии кодирующей последовательности. Примерами функционально связанных последовательностей являются адресующие последовательности или энхансеры трансляции, энхансеры, сигналы полиаденилирования и тому подобное. Дополнительные регуляторные элементы включают селективные маркеры, сигналы амплификации, точки начала репликации и тому подобное.

В дополнение к искусственным регуляторным последовательностям перед интересующим структурным геном может находиться еще и природная регуляторная последовательность. При необходимости эта естественная регуляция может быть выключена путем генетической модификации, и экспрессия генов может быть повышена или понижена. Однако данная генная конструкция может также быть упрощена по своей структуре, то есть перед структурным геном не вставляется никаких дополнительных регуляторных сигналов, и природный промотор с его регуляцией не удаляется. Вместо этого природную регуляторную последовательность мутируют таким образом, что регуляция больше не осуществляется, и экспрессия гена увеличивается или уменьшается. В генной конструкции может присутствовать одна или более копий последовательностей нуклеиновой кислоты.

Примерами подходящих промоторов являются: cos, tac, trp, tet, trp-tet, lpp, lac, lpp-lac, lacIq, T7, T5, T3, gal, trc, ara, SP6, I-PR или I-PL промоторы, которые преимущественно применяются в грамотрица-

тельных бактериях; и грамположительные промоторы amy и SPO2, промоторы дрожжей ADC1, MFa, Ac, P-60, CYC1, GAPDH, TEF1, или растительные промоторы CaMV/35S, SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos, или промотор убиквитина или фазеолина. Особое предпочтение отдается применению индуцибельных промоторов, например светоиндуцируемым и особенно температурно-индуцируемым промоторам, таким как промотор PrP1.

В принципе могут применяться все природные промоторы с их регуляторными последовательностями. Кроме того, синтетические промоторы также могут применяться в предпочтительном случае.

Указанные выше регуляторные последовательности предназначены для обеспечения целевой экспрессии последовательностей нуклеиновых кислот и экспрессии белка. В зависимости от организма-хозяина это может означать, например, что ген экспрессируется или суперэкспрессируется только после того, как произошла индукция, или что он экспрессируется и/или суперэкспрессируется немедленно и/или конститутивно.

Регуляторные последовательности или факторы могут предпочтительно обладать положительным действием на экспрессию и, таким образом, увеличивать или уменьшать экспрессию. Таким образом, усиление регуляторных элементов предпочтительно может проходить на уровне транскрипции с помощью сильных сигналов транскрипции, таких как промоторы и/или "энхансеры". Кроме того, трансляция также может быть усилена путем повышения, например, стабильности мРНК.

Кассета экспрессии конструируется путем слияния подходящего промотора с подходящей нуклеотидной последовательностью, кодирующей ацетилтрансферазу, и терминаторным сигналом или сигналом полиаденилирования. С этой целью используются обычные методы рекомбинации и клонирования, которые описаны, например, в T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) и в T.J. Silhavy, M.L. Berman and L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1984) и в Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987).

Для экспрессии в подходящем организме-хозяине конструкция рекомбинантной нуклеиновой кислоты или генная конструкция предпочтительно встраивается в вектор, специфичный для клетки-хозяина, который обеспечивает оптимальную экспрессию гена в данной клетке-хозяине. Векторы хорошо известны специалисту в данной области техники и могут быть найдены, например, в "Cloning Vectors" (Pouwels P.H. et al., Ed., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985). Под векторами следует понимать не только плазмиды, но и все другие векторы, известные специалистам в данной области техники, такие как, например, фаги, вирусы, такие как SV40, CMV, бакуловирусы и аденовирусы, транспозоны, IS-элементы, плазмиды, космиды и линейные или кольцевые ДНК. Эти векторы могут реплицироваться в организме-хозяине автономно или в составе хромосомы.

Векторы согласно настоящему изобретению позволяют получать рекомбинантные микроорганизмы, которые трансформированы, например, по меньшей мере одним вектором согласно настоящему изобретению и которые могут быть использованы для получения мутантов. Описанные выше рекомбинантные конструкции согласно настоящему изобретению предпочтительно вводятся в подходящий организм-хозяин и экспрессируются. Предпочтительно применять обычные методы клонирования и трансфекции, известные специалисту в данной области техники для того, чтобы обеспечить экспрессию указанных выше нуклеиновых кислот в системе экспрессии, о которой идет речь. Подходящие системы описаны, например, в Current protocols in molecular biology, F. Ausubel et al., Ed., Wiley Interscience, New York 1997.

Пригодными организмами-хозяевами, в принципе, являются все организмы, которые обеспечивают экспрессию нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению, их аллельных вариантов и их функциональных эквивалентов или производных. Предпочтительными исходными организмами являются такие, которые в природе способны синтезировать каротиноиды. Однако исходные организмы, способные синтезировать каротиноиды вследствие введения в них генов биосинтеза каротиноидов, также являются пригодными. Под исходными организмами имеются в виду прокариотические или эукариотические организмы, такие как, например, микроорганизмы или растения. Предпочтительными микроорганизмами являются бактерии, дрожжи, водоросли или грибы.

Таким образом, настоящее изобретение также касается способа получения генетически модифицированных организмов, описанных ниже, где гены ацетилтрансферазы согласно настоящему изобретению включаются в геном исходного организма. Под исходными организмами понимаются организмы до генетической модификации согласно настоящему изобретению.

Гены ацетилтрансферазы согласно настоящему изобретению в принципе могут быть введены всеми способами, известными специалисту в данной области техники, в исходные организмы, описанные ниже, которые становятся генетически модифицированными.

Они предпочтительно вводятся в исходные организмы или их клетки с помощью трансформации, трансфекции, конъюгации, электропорации, с использованием так называемой пушки для частиц или путем микроинъекции.

Квалифицированный специалист может найти соответствующие методы для микроорганизмов в следующих руководствах: Sambrook, J. Et al. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring

Harbor Laboratory Press, F.M. Ausubel et al. (1994) Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sons, D.M. Glover et al., DNA Cloning Vol. 1, (1995), IRL Press (ISBN 019-963476-9), Kaiser et al. (1994) Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press или Guthrie et al. Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, 1994, Academic Press.

Примерами предпочтительных методов, которые могут быть отмечены, являются такие, как введение ДНК путем гомологичной или гетерологичной рекомбинации, например, с помощью гена URA3, особенно гена URA3 из Ashbya, как описано в немецкой заявке на патент DE 19801120.2, и/или методом REMI (="restriction enzyme mediated integration", интеграция, опосредованная ферментами рестрикции), который описан ниже.

Метод REMI основан на котрансформации в организм линейной конструкции ДНК, которая обрезана на обоих концах одной и той же эндонуклеазой рестрикции, вместе с данной эндонуклеазой рестрикции, которая использовалась для рестрикции конструкции ДНК. Эндонуклеаза рестрикции далее разрезает геномную ДНК организма, в который конструкция ДНК была введена вместе с ферментом рестрикции. Это приводит к активации собственных механизмов репарации в клетках. Эти механизмы репарации восстанавливают разрывы в цепях геномной ДНК, которые были вызваны эндонуклеазой, и в процессе этого с определенной частотой в геном также включается котрансформированная конструкция ДНК. Обычно в процессе этого данные сайты рестрикции сохраняются на обоих концах ДНК.

Этот метод был описан Bölker et al. (Mol. Gen. Genet. 1995, 248: 547-552) для инсерционного мутагенеза (путем вставки) у грибов. Метод был использован Von Schiestl and Petes (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88: 7585-7589) для того, чтобы выяснить, имеется ли гетерологичная рекомбинация у Saccharomyces. Этот метод был описан Brownetal (Mol. Gen. Genet. 1996, 251: 75-80) для стабильной трансформации и регулируемой экспрессии индуцибельного репортерного гена.

С помощью метода REMI можно ввести фрагменты нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению или вышеупомянутые гены ацетилтрансферазы согласно настоящему изобретению в транскрипционно активные участки генома.

Клонировать нуклеиновые кислоты в конструкцию ДНК, которая вводится в геном, можно и выгодно вместе по меньшей мере с одним геном-репортером. Этот ген-репортер должен легко выявляться по изменению процесса роста путем измерения флуоресценции, хемо- или биолюминесценции или с помощью фотометрических измерений. Примерами репортерных генов, которые можно упомянуть, являются гены устойчивости к антибиотикам, гены гидролаз, гены флуоресцентных белков, гены биолюминесценции, гены глюкозидазы, ген люциферазы, ген бета-галактозидазы, ген GFP, ген липазы, ген эстеразы, ген пероксидазы, ген бета-лактамазы, ген ацетил-, фосфо- или аденилтрансферазы. Эти гены обеспечивают возможность легко измерить и количественно оценить транскрипционную активность и, следовательно, экспрессию данных генов. Это означает, что можно идентифицировать участки в геноме, которые различаются по продуктивности до 2 порядков величины.

Если целью является введение в организм множества генов, таких как, например, дополнительные гены биосинтеза каротиноидов, все они могут быть введены в организм вместе с геном-репортером в одном векторе, или каждый отдельный ген с геном-репортером может быть введен в организм в виде отдельного вектора, причем можно ввести различные векторы одновременно или последовательно. С использованием метода REMI можно также встроить фрагменты генов, кодирующие соответствующие активности.

Ферменты рестрикции, в принципе пригодные для введения генов ацетилтрансферазы или конструкций нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению в геном исходных организмов, известны квалифицированному специалисту в данной области. Ферменты рестрикции, которые распознают только 4 пары оснований в качестве сайта рестрикционного расщепления, являются менее предпочтительными, поскольку они слишком часто делают разрывы в геноме или векторе, который должен быть интегрирован, и предпочтительные ферменты распознают 6, 7, 8 или более пар оснований в качестве сайта расщепления, такие как, например, BamHI, EcoRI, BglII, SphI, SpeI, XbaI, XhoI, NcoI, SalI, ClaI, KpnI, HindIII, SacI, PstI, BpnI, NotI, SrfI или SfiI, чтобы упомянуть хотя бы некоторые из возможных ферментов. Выгодно, если используемые ферменты больше не имеют сайтов расщепления в ДНК, которую надо ввести; это повышает эффективность интеграции. Обычно в смеси REMI используется от 5 до 500 единиц, предпочтительно от 10 до 250, особенно предпочтительно от 10 до 100 единиц ферментов. Ферменты преимущественно используют в виде водного раствора, который содержит вещества для осмотической стабилизации, такие как сахара, такие как сахароза, трегалоза или глюкоза, полиолы, такие как глицерин или полиэтиленгликоль, буфер с предпочтительной емкостью в диапазоне pH от 5 до 9, предпочтительно от 6 до 8, особенно предпочтительно от 7 до 8, такой как Трис, MOPS, HEPES, MES или PIPES, и/или вещества для стабилизации нуклеиновых кислот, такие как неорганические или органические соли Mg, Cu, Co, Fe, Mn или Mo. Кроме того, в случае необходимости могут присутствовать и другие вещества, такие как EDTA, EDDA, DTT, бета-меркптоэтанол или ингибиторы нуклеаз. Однако можно применять метод REMI и без использования этих добавок.

Данный процесс проводится при температуре в диапазоне от 5 до 80°C, предпочтительно от 10 до 60°C, особенно предпочтительно от 20 до 40°C. Для данного процесса являются подходящими и другие

известные способы дестабилизации клеточных мембран, такие как, например, электропорация, слияние с нагруженными везикулами или дестабилизация с помощью солей различных щелочных металлов или щелочноземельных металлов, таких как соли лития, рубидия или кальция, соли лития являются предпочтительными.

Кроме того, настоящее изобретение касается соответствующим образом генетически модифицированного организма с экспрессией генов ацетилтрансферазы согласно настоящему изобретению, увеличенной по сравнению с организмом дикого типа в случае, когда исходный организм содержит ген ацетилтрансферазы или когда исходный организм не содержит гена ацетилтрансферазы, и данный ген введен путем генетической модификации.

Генетически модифицированный организм означает организм, в который был введен ген (гены) ацетилтрансферазы или конструкция (конструкции) нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, предпочтительно одним из описанных выше способов.

Генетически модифицированный организм содержит по меньшей мере один ген ацетилтрансферазы согласно настоящему изобретению или по меньшей мере одну конструкцию нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению. В зависимости от исходного организма нуклеиновая кислота может входить в состав или находиться вне хромосомы.

Метаболизм каротиноидов в генетически модифицированных организмах предпочтительно изменен по сравнению с диким типом.

Предпочтительными микроорганизмами являются рекомбинантные бактерии, растения, грибы или дрожжи. В конкретном воплощении рекомбинантный гриб является олеогенным, то есть он может накапливать липиды по меньшей мере примерно до 20% от сухого веса его клеток; и продуцирует по меньшей мере один каротиноид, выбираемый из группы, состоящей из антераксантина, адонирубина, адониксантина, астаксантина, кантаксантина, капсорубина, β-криптоксантина, α-каротина, δ-каротина, ε-каротина, эхиненона, 3-гидроксиэхиненона, 3'-гидроксиэхиненона, γ-каротина, ψ-каротина, 4-кето-γ-каротина, ζ-каротина, α-криптоксантина, β-криптоксантина, деоксифлексиксантина, диатоксантина, 7,8-дидегидроастаксантина, дидегидроликопина, фукоксантина, фукоксантинола, изорениератина, β-изорениератина, лактукаксантина, лютеина, ликопина, миксобактона, неоксантина, нейроспорина, гидроксинейроспорина, перидинина, фитоена, родопина, родопинглюкозида, 4-кето-рубиксантина, сифонаксантина, сфероидина, сфероиденона, спириллоксантина, торулина, 4-кето-торулина, 3-гидрокси-4-кето-торулина, уриолида, уриолидацетата, виолаксантина, зеаксантин-β-диглюкозида, зеаксантина, C30 каротиноида, а также их комбинаций, и может накапливать продуцируемый каротиноид по меньшей мере примерно до 1% от сухого веса его клеток. Еще более предпочтительно рекомбинантный гриб является членом рода, выбираемого из группы, состоящей из Aspergillus, Blakeslea, Botrytis, Candida, Cercospora, Cryptococcus, Cunninghamella, Fusarium (Gibberella), Kluyveromyces, Lipomyces, Mortierella, Mucor, Neurospora, Penicillium, Phycomyces, Pichia (Hansenula), Puccinia, Pythium, Rhodosporidium, Rhodotorula, Saccharomyces, Sclerotium, Trichoderma, Trichosporon, Xanthophyllomyces (Phaffia) и Yarrowia, или является видом, выбираемым из группы, состоящей из Aspergillus terreus, Aspergillus nidulans, Aspergillus niger, Blakeslea trispora, Botrytis cinerea, Candida japonica, Candida pulcherrima, Candida revkaufi, Candida tropicalis, Candida utilis, Cercospora nicotianae, Cryptococcus curvatus, Cunninghamella echinulata, Cunninghamella elegans, Fusarium fujikuroi (Gibberellazeae), Kluyveromyces lactis, Lipomyces starkeyi, Lipomyceslipoferus, Mortierella alpina, Mortierella ramanniana, Mortierellaisabellina, Mortierellavinacea, Mucor circinelloides, Neurospora crassa, Phycomyces blakesleanus, Pichia pastoris, Puccinia distincta, Pythium irregulare, Rhodosporidium toruloides, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula graminis, Rhodotorula mucilaginosa, Rhodotorula pinicola, Rhodotorula gracilis, Saccharomyces cerevisiae, Sclerotium rolfsii, Trichoderma reesei, Trichosporon cutaneum, Trichosporon pullulans, Xanthophyllomyces dendrorhous (Phaffia rhodozyma) и Yarrowia lipolytica.

Из этих природных олеогенных штаммов некоторые также естественным образом продуцируют каротиноиды, а некоторые нет; эти штаммы могут быть дополнительно использованы в качестве клетки-хозяина путем введения генов биосинтеза каротиноидов, как раскрыто в патенте США № 7851199.

В конкретном воплощении рекомбинантная бактерия является грамотрицательной или грамположительной. Грамположительные бактерии-хозяева включают, но ими не ограничиваются, Bacillus, Brevibacillus, Clostridium, Geobacillus, Lactobacillus, Lactococcus, Paenibacillus и Streptomyces. Грамотрицательные бактерии включают, но ими не ограничиваются, E.coli, Pseudomonas и Paracoccus.

Рекомбинантным бактериальным хозяином может быть любой представитель Bacillales, включая, но ими не ограничиваясь, Bacillus amyloliquefaciens, Brevibacillus brevis, Bacillus circulans, Bacillus clausii, Bacillus coagulans, Bacillus lentus, Bacillus licheniformis, Geobacillus stearothermophilus, Bacillus subtilis и Bacillus thuringiensis. Рекомбинантным бактериальным хозяином также может быть любой представитель Streptomyces, включая, но ими не ограничиваясь, Streptomyces achromogenes, Streptomyces avermitilis, Streptomyces coelicolor, Streptomyces griseus и Streptomyces lividans. Рекомбинантным бактериальным хозяином также может быть любой представитель Paracoccus включая, но ими не ограничиваясь, Paracoccus denitrificans, Paracocc usversutus, Paracoccus carotinifaciens, Paracoccus marcusii и Paracoccus zeaxanthinifaciens. Рекомбинантная бактерия продуцирует по меньшей мере один каротиноид, выбираемый из

группы, состоящей из антераксантина, адонирубина, адониксантина, астаксантина, кантаксантина, капсорубина, β-криптоксантина, α-каротина, δ-каротина, ε-каротина, эхиненона, 3-гидроксиэхиненона, 3'-гидроксиэхиненона, γ-каротина, ψ-каротина, 4-кето-γ-каротина, ζ-каротина, α-криптоксантина, деоксифлексиксантина, диатоксантина, 7,8-дидегидроастаксантина, дидегидроликопина, фукоксантина, фукоксантинола, изорениератина, β-изорениератина, лактукаксантина, лютеина, ликопина, миксобактона, неоксантина, нейроспорина, гидроксинейроспорина, перидинина, фитоена, родопина, родопинглюкозида, 4-кето-рубиксантина, сифонаксантина, сфероидина, сфероиденона, спириллоксантина, торулина, 4-кето-торулина, 3-гидрокси-4-кето-торулина, уриолида, уриолидацетата, виолаксантина, зеаксантин-β-диглюкозида, зеаксантина, С30 каротиноида, а также их комбинаций.

В других воплощениях настоящее изобретение предоставляет способ получения каротиноида, при этом способ включает этапы культивирования гриба или бактерии в условиях, которые обеспечивают продукцию каротиноида; и выделение продуцируемого каротиноида.

Культивирование генетически модифицированного организма согласно настоящему изобретению обеспечивается известным способом, например, таким как культивирование соответствующего дикого типа, например, в случае микроорганизмов - в подходящей питательной среде, такой как, например, на чашках с агаром или в культуре в суспензии, или в случае растений - в почве или соответствующей подходящей питательной среде. Под сбором "урожая" в случае микроорганизмов подразумевается выделение микроорганизмов, а в случае растения - срезка растений или, где это применимо, отдельных частей растений, содержащих каротиноиды. Каротиноиды выделяются известным способом, например путем разрушения клеток организма, экстракции каротиноидов и последующей очистки каротиноидов химическими или физическими методами разделения, такими как экстракция или хроматография.

Следующие примеры иллюстрируют настоящее изобретение.

Табл. 1 ниже описывает некоторые штаммы Yarrowia lipolytica, используемые в приведенных ниже примерах

Таблица 1

Штаммы Yarrowia lipolytica

Номер штамма	Генотип	Как сконструирован
ML9863	*MATB erg9-4789::ura3 {HMG-tr GGS carB carRP crtW Xa-crtZ Dc-crtZ}* прототрофный	Классические и стандартные методы молекулярной генетики
ML9335	*MATAerg9-4789::ura3 {HMG-trGGScarBcarRPcrtWDc-crtZ}* прототрофный	Классические и стандартные методы молекулярной генетики
ML12526	ML9335 плюс добавочные копии*HMG-tr carB* 3X-*carRP*	Ненаправленные трансформации с последующим удалением Hyg^RиNat^Rс использованием системы*cre-lox*
ML11218	ML9863 *crtW-Δ6180*	Направленное разрушение с кассетой Hyg^R; последующее удаление маркеров с использованием системы *cre-lox*

Штаммы Yarrowia ML9863 и ML9335 были сконструированы путем введения гетерологичных генов под контроль конститутивных промоторов в сочетании с несколькими поколениями перекрестного скрещивания, начиная с ML350 и ATCC201249, как описано в патенте США № 7851199. Ген GGS и укороченный ген HMG ("HMG-tr") были получены из последовательностей Yarrowia, соответствующих нативным генам геранилгеранилпирофосфатсинтазы и гидроксиметилглутарил-CoA-редуктазы соответственно. Гены carRP и carB были получены из Mucor circinelloides, и они кодируют бифункциональную фитоинсинтазу/ликопинциклазу и фитоиндегидрогеназу соответственно. Ген crtW был синтезирован для кодирования каротинкетолазы из Parvularcula bermudensis. Ген crtZ амплифицировали из Xanthobacter autotrophicus (Xa) или синтезировали для кодирования каротингидроксилазы из Cronobacter pulveris (ранее известной как Enterobacter pulveris) (Ep) или бактерии Enterobacteriaceae DC404 (Dc). Эти гены иногда, но не всегда, связаны с ауксотрофными маркерами (URA3, LEU2, URA2, LYS1, ADE1) или сайтом loxP, фрагментом маркера Hyg® или Nat®.

Таблица 2

Плазмиды

Плазмида	Основа	Вставка	Источник
pMB6532	pMB6157 (Hyg^R)	*Sc-ATF1*	Синтезированный фрагмент*Nhe*I – *Mlu*I
pMB6563	pMB6532	*Sc-ATF1* (2-якопия)	Синтезированный фрагмент *Nhe*I – *Mlu*I
pMB6608	pMB6563	Nat^R	pMB6200
pMB6732	pMB6157	*Sb-ATF1*	Синтезированный фрагмент *Nhe*I – *Mlu*I
pMB6733	pMB6157	*Sk-ATF1*	Синтезированный фрагмент *Nhe*I – *Mlu*I
pMB6812	pMB6157	*Sa-ATF1*	Синтезированный фрагмент *Nhe*I – *Mlu*I
pMB6655	pMB6157	Hyg^R	
pMB6674	pMB6157	Hyg^R	
pMB6769	pMB6655	*Sb-ATF1*	Синтезированный фрагмент *Nhe*I – *Mlu*I
pMB6771	pMB6674	*Sb-ATF1*	Синтезированный фрагмент *Nhe*I – *Mlu*I
pMB6832	pMB6771 (Hyg^R)	*Sb-ATF1* – *Sb-ATF1*	pMB6732
pMB7006	pRK415	Tet^R	Ссылка на статью (Ref paper?)
pMB6976	pRK-P*crtE-crtE*	*Sb ATF1* (дикий тип)	Синтезированный фрагмент *Nde*I – *Hind*III
pMB6977	pRK-P*crtE-crtE*	*Sc-ATF1* (дикий тип с удаленным сайтом *Nde*IвORF)	Синтезированный фрагмент*Nde*I – *Hind*III
pMB6978	pRK-P*crtE-crtE*	*Sb-ATF1*	Синтезированный фрагмент *Nde*I – *Hind*III
pMB6979	pRK-P*crtE-crtE*	*Sc-ATF1*	Синтезированный фрагмент *Nde*I – *Hind*III

Все основные методы молекулярной биологии и методы манипулирования ДНК, описанные в данном документе, как правило, выполняются в соответствии с Sambrook et al. или Ausubel et al. (J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis (eds). 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York; F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl (eds). 1998. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley: New York).

Пример 1a. Получение плазмиды pMB6532, кодирующей ацетилтрансферазу ATF1 S. cerevisiae.

Ген ATF1 из Saccharomyces cerevisiae был оптимизирован по кодонам в соответствии с индексом частоты использования кодонов-синонимов в геноме Yarrowia, и фрагмент ДНК, приведенный в SEQ ID NO: 9, синтезировали de novo. При синтезе de novo непосредственно перед кодоном ATG была добавлена последовательность 5'-TGCTAGCCACAAAA, содержащая сайт рестрикции NheI, и типичная последовательность Козак для обеспечения эффективной трансляции. Последовательность ACGCGT-3', содержащая сайт рестрикции MluI, была добавлена непосредственно после стоп-кодона. Эта последовательность была расщеплена с помощью NheI и MluI и лигирована с плазмидой pMB6157, расщепленной NheI и MlnI, для получения плазмиды pMB6532. Полученный белок, кодируемый геном Sc-ATF1 плазмиды pMB6532, приведен в SEQ ID NO: 5. Эта плазмида была затем расщеплена EcoRV, и кассета, содержащая Sc-ATF1, была дублирована путем вставки фрагмента SspI-PvuII, размером 2,35 т.п.о. из той же плазмиды, чтобы создать плазмиду pMB6563, которая кодирует конвертирующие транскрипты Sc-ATF1, фланкирующие маркер Hyg®. Маркер Nat®, обеспечивающий устойчивость к нурсеотрицину, был использован в этой плазмиде для замены Hyg® путем расщепления плазмиды pMB6563 SspI и BamHI и лигирования ее с фрагментом SspI -BamHI размером 1,3 т.п.о. из плазмиды pMB6200, для получения плазмиды pMB6608.

Пример 1b. Введение ацетилтрансферазы ATF1 S.cerevisiae в штамм Yarrowia, способный продуцировать зеаксантин.

Штамм ML11218 был трансформирован фрагментом PvuII из плазмиды MB6563, включающим две копии Sc-ATF1 под контролем конститутивных промоторов и селективный маркер устойчивости к гигромицину Hyg®. Были выбраны 10 устойчивых к гигромицину трансформантов, выросших на чашке с селективной средой (среда YPD+100 мг/л гигромицина) через 3-4 дня роста при 30°C. Большинство трансформантов продуцировало от 14 до 17% моноацетилированного зеаксантина и от 42 до 57% диацетилированного зеаксантина (в процентах от общего содержания зеаксантина) при выращивании на среде YPD в течение 4 дней при 30°C. Продукция свободного зеаксантина составляла от 27 до 42% от общего содержания зеаксантина. Один штамм, ML12641, был выбран для дальнейшего конструирования.

Штамм ML12641 трансформировали XbaI-обработанной MB6608, содержащей две копии Sc-ATF1 под контролем конститутивных промоторов и селективный маркер устойчивости Nat®. Были выбраны 10 устойчивых к нурсеотрицину трансформантов, выросших на чашке с селективной средой (среда YPD +100 мг/л нурсеотрицина) через 3-4 дня роста при 30°C. Некоторые трансформанты продуцировали от 9 до 16% моноацилированного и от 56 до 80% диацетилированного зеаксантина (в процентах от общего

содержания зеаксантина) при выращивании в YPD в течение 4 дней при 30° С. Продукция свободного зеаксантина составляла от 11 до 28% от общего содержания зеаксантина. Один штамм, ML12735, был выбран для дальнейшего анализа и для выращивания в ферментере с одноразовой загрузкой.

Штамм ML12735 выращивали в ферментере с одноразовой загрузкой. Общая продукция зеаксантина (свободный плюс этерифицированный) увеличилась в два раза по сравнению со штаммом ML11218, который не содержит ни одной копии гена Sc-ATF1. Кроме того, фиг. 1 показывает, что продукция зеаксантина штаммом ML11218 резко возрастает в начале ферментации, затем достигает плато, и продукция зеаксантина прекращается. В отличие от этого несмотря на то, что штамм ML12735 имеет аналогичный профиль продукции в начале процесса ферментации, продукция зеаксантина продолжает расти и после предела, достигаемого штаммом ML11218, и процесс ферментации поддерживает свою продуктивность в течение длительного периода в отличие от штамма ML1218.

Пример 1c. Введение ацетилтрансферазы ATF1 S.cerevisiae в штамм Yarrowia, способный продуцировать астаксантин.

Штамм ML12526 трансформировали плазмидой MB6563 (которая содержит конвертирующие транскрипты ATF1, фланкирующие маркер Hyg®), обработанной с XbaI. Пять устойчивых к гигромицину трансформантов отобрали с чашки с селективной средой (среда YPD+100 мг/л гигромицина) через 3-4 дня роста при 30°С. После последующего выращивания в течение 3-4 дней в среде YPD в колбах при встряхивании при 30°С трансформанты продуцировали от 22 до 29% моноацетилированного и от 16 до 56% диацетилированного астаксантина (в процентах от общего содержания астаксантина). Продукция свободного астаксантина составляла от 19 до 59% от общего содержания астаксантина. Один штамм, ML12707, был выбран для дальнейшего анализа и для выращивания в ферментере с одноразовой загрузкой.

Штамм ML12707 выращивали в ферментере с одноразовой загрузкой. Фиг. 2 показывает, что скорость продукции астаксантина штаммом ML12707 выше в начале процесса ферментации и достигает более высокого титра в конце выращивания по сравнению со штаммом ML12562, который не содержит ни одной копии гена Sc-ATF1.

Пример 2a. Получение плазмид pMB6732, pMB6733 и pMB6812, кодирующих ацетилтрансферазу ATF1 S.bayanus, S.kudriavzevii и S.arboricolus соответственно.

Плазмиды были получены для экспрессии генов ATF1 из разных видов Saccharomyces, как описано в табл. 2. Гены ATF1 из Saccharomyces bayanus (Sb), Saccharomyce skudriavzevii (Sk), и Saccharomyces arboricolus (Sa) были оптимизированы по кодонам в соответствии с индексом случайности использования кодонов-синонимов в геноме Yarrowia, и фрагменты ДНК, приведенные в SEQ ID NO: 10, 12, и 15 соответственно, синтезировали de novo. При синтезе de novo разных генов ATF1 непосредственно перед кодоном ATG была добавлена последовательность 5'-TGCTAGCCACAAAA, содержащая сайт рестрикции NheI, и типичная последовательность Козак для обеспечения эффективной трансляции. Последовательность ACGCGT-3', содержащая сайт рестрикции MluI, была добавлена непосредственно после стопкодона. Данные последовательности расщепляли с помощью NheI и MlnI и лигировали с плазмидой pMB6157, расщепленной NheI и MlnI, для получения плазмид pMB6732, pMB6733 и pMB6812 соответственно. Полученные белки, кодируемые генами ATF1 в pMB6732, pMB6733 и pMB6812, приведены в SEQ ID NO: 6, 8 и 14 соответственно.

Пример 2b. Получение плазмиды pMB6832, несущей две копии ацетилтрансферазы ATF1 S. Bayanus.

Ген ATF1 S. bayanus был также вставлен, как описано выше, в два других вектора, несущие конститутивные промоторы (pMB6655 и pMB6674), для получения плазмид pMB6769 и pMB6771, и две разные кассеты были объединены путем переноса фрагмента PvuII - SspI из pMB6769, несущего одну кассету, в расщепленную EcoRV плазмиду pMB6771, несущую другую кассету и маркер устойчивости к гигромицину, для получения плазмиды pMB6832.

Пример 2c. Введение генов ацетилтрансферазы ATF1 из S.bayanus, S. kudriavzevii и S.arboricolus в штамм Yarrowia, способный продуцировать зеаксантин.

Штамм ML11218 был независимо трансформирован плазмидами MB6732 (Sb-ATF1), MB6733 (Sk-ATF1) и MB6812 (Sa-ATF1), которые были обработаны XbaI. Было отобрано по 10 устойчивых к гигромицину трансформантов для каждой плазмиды с чашки с селективной средой (среда YPD+100 мг/л гигромицина)через 3-4 дня роста при 30°С. После последующего выращивания в течение 3-4 дней при встряхивании в колбах со средой YPD при 30°С трансформанты анализировались на продукцию зеаксантина по сравнению с контрольным штаммом ML11218. Трансформанты, несущие ATF1 S.bayanus (pMB6732), продуцировали от 4 до 16% моноацетилированного зеаксантина и от 46 до 85% диацетилированного зеаксантина (в процентах от общего содержания зеаксантина). Продукция свободного зеаксантина составляла от 8 до 38% от общего содержания зеаксантина. Один трансформант, несущий ATF1 S.kudriavzevii (pMB6733),продуцировал около 3% моноацетилированного зеаксантина и не продуцировал диацетилированный зеаксантин (в процентах от общего содержания зеаксантина). Трансформанты, несущие ATF1 S.arboricolus (pMB6812),продуцировали от 20 до 22% моноацетилированного зеаксантина и от 30 до 45% диацетилированного зеаксантина (в процентах от общего содержания зеаксантина). Про-

дукция свободного зеаксантина составляла от 34 до 49% от общего содержания зеаксантина.

ATF1 S.bayanus была выбрана для дальнейших исследований и для изучения ее ацетилирующей способности в ферментерах. Штамм ML11218 был трансформирован фрагментом PvuIIpMB6832, несущим две копии ATF1 S.bayanus. Шесть устойчивых к гигромицину трансформантов было отобрано с чашки с селективной средой (среда YPD+100 мг/л гигромицина) через 3-4 дня роста при 30°C. После последующего выращивания в течение 3-4 дней в среде YPD при встряхивании в колбах при 30°C анализ показал, что трансформанты продуцировали от 5 до 6% моноацетилированного зеаксантина и от 83 до 90% диацетилированного зеаксантина (в процентах от общего содержания зеаксантина). Продукция свободного зеаксантина составляла от 4 до 14% от общего уровня зеаксантин. Один штамм, ML13129, был выбран для дальнейшего анализа и для выращивания в ферментере с однократной загрузкой.

Штамм ML13129 выращивали в ферментере с однократной загрузкой. Продукция общего зеаксантина (свободный плюс этерифицированный) увеличилась в 1,8 раза по сравнению со штаммом ML11218, который не содержит ни одной копии гена Sb-ATF1. Кроме того, фиг. 3 показывает, что продукция зеаксантина в обоих штаммах имеет аналогичный профиль продукции на ранних стадиях ферментации, но продукция зеаксантина в 1218 МЛ1 достигает плато и прекращается. В отличие от этого продукция зеаксантина продолжает увеличиваться в штамме ML13129 выше предела, достигаемого ML11218, приближаясь к почти удвоенному значению этого уровня.

Пример 2d. Введение генов ацетилтрансферазы ATF1 из S. bayanus и S. kudriavzevii в штамм Yarrowia, способный продуцировать астаксантин.

Штамм ML12526 был независимо трансформирован плазмидами MB6732 (Sb-ATF1) и MB6733 (Sk-ATF1), которые были обработаны XbaI. 10 устойчивых к гигромицину трансформантов для каждой плазмиды было отобрано с чашек с селективной средой (среда YPD+100 мг/л гигромицина) через 3-4 дня роста при 30°C. После последующего выращивания в течение 3-4 дней в среде YPD при встряхивании в колбах при 30°C трансформанты анализировались на продукцию астаксантина по сравнению с контрольным штаммом ML12526. Трансформанты, несущие плазмиду pMB673 с 2Sb-ATF1, продуцировали от 16 до 30% моноацетилированного астаксантина и от 57 до 76% диацетилированного астаксантина (в процентах от общего содержания астаксантина). Продукция свободного астаксантина составляла от 8 до 37% от общего уровня астаксантина. Трансформанты, несущие плазмиду с pMB6733Sk-ATF1, продуцировали от 9 до 24% моноацетилированного астаксантина и от 1 до 6% диацетилированного астаксантина (в процентах от общего содержания астаксантина). Продукция свободного астаксантина составляла от 70 до 90% от общего уровня астаксантина. Один штамм, ML12819, несущий плазмиду с pMB6732Cb-ATF1, был выбран для дальнейшего анализа и для выращивания в ферментере с однократной загрузкой. Штамм ML12819 выращивали в ферментере с однократной загрузкой. Фиг. 4 показывает, что скорость продукции астаксантина в штамме ML12819 такая же по сравнению со штаммом ML12562, который не несет гена Sb-ATF1, но достигает более высокого титра в конце процесса ферментации.

Пример 3a. Получение плазмид pMB6976, pMB6977, pMB6978 и pMB6979, кодирующих нативные и оптимизированные по кодонам ATF1 S.bayanus и S.cerevisiae.

Гены ATF1 S.bayanus и S.cerevisiae были оптимизированы по кодонам для экспрессии в Paracoccus sp. штамм R114/pBBR-K-mev-op-R114-PcrtE-crtE$_{R114}$ (патенты US № 20070202579 A1, US № 7232679 B2) с помощью таблицы использования кодонов Paracoccous denitrificans PD1222, и фрагменты ДНК, приведенные в SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17 соответственно, были синтезированы de novo. Неоптимизированные по кодонам гены ATF1 S.bayanus и S.cerevisiae, приведенные в SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 18, также были синтезированы de novo. Ген ATF1 S.cerevisiae дикого типа содержит сайт NdeI, который был удален во время синтеза de novo. При синтезе de novo непосредственно перед кодоном ATG была добавлена последовательность 5'-CAT, чтобы создать сайт рестрикции NdeI. Последовательность AAGCTT-3', содержащая сайт рестрикции HindIII, была добавлена непосредственно после стоп-кодона. Обе версии ATF1 S.bayanus и S.cerevisiae, оптимизированную по кодонам и неоптимизированную по кодонам, клонировали под контроль промотора crtE Paracoccus с использованием плазмиды pRK-PcrtE-crtE (получена из плазмиды pRK415, Keen, et al., Gene. 1988, 70: 191-197), которую расщепляли NdeI и HindIII для получения плазмид pMB6976 (Sb-ATF1 дикого типа), pMB6977 (Sc-ATF1 дикого типа), pMB6978 (Sb-ATF1, оптимизированный по кодонам) и pMB6979 (Sc-ATF1, оптимизированный по кодонам). Полученный белок, кодируемый генами Sb-ATFI в pMB6976 и pMB6978, приведен в SEQ ID NO: 6. Полученный белок, кодируемый генами Sc-ATF1 в pMB6977 и pMB6979, приведен в SEQ ID NO: 5.

Табл. 3 ниже описывает штаммы E.coli, используемые в приведенных ниже примерах.

Таблица 3

Штаммы E.coli

Штамм	Введенный ген	Как сконструирован
MB7006	нет	Трансформация
MB7007	*Sb-ATF1* дикого типа	Трансформация
MB7008	*Sc-ATF1* дикого типа	Трансформация
MB7009	*Sb-ATF1*, оптимизированный по кодонам	Трансформация
MB70010	*Sc-ATF1*, оптимизированный по кодонам	Трансформация

Табл. 4 ниже описывает штаммы Paracoccus, используемые в приведенных ниже примерах.

Таблица 4

Штаммы Paracoccus zeaxanthinifaciens

Штамм	Введенный ген	Как сконструирован
R114/pBBR-K-mev-op-R114-P*crtE-crtE*$_{R114}$ + pMB7006	нет	Конъюгация с MB7006 (отбор на Rif^R и Tet^R)
R114/pBBR-K-mev-op-R114-P*crtE-crtE*$_{R114}$ + pMB7007	*Sb-ATF1* дикого типа	Конъюгация с MB7007 (отбор на Rif^R и Tet^R)
R114/pBBR-K-mev-op-R114-P*crtE-crtE*$_{R114}$ + pMB7008	*Sc-ATF1* дикого типа	Конъюгация с MB7008 (отбор на Rif^R и Tet^R)
R114/pBBR-K-mev-op-R114-P*crtE-crtE*$_{R114}$ + pMB7009	*Sb-ATF1*, оптимизированный по кодонам	Конъюгация с MB7009 (отбор на Rif^R и Tet^R)
R114/pBBR-K-mev-op-R114-P*crtE-crtE*$_{R114}$ + pMB70010	*Sc-ATF1*, оптимизированный по кодонам	Конъюгация с MB70010 (отбор на Rif^R и Tet^R)

Пример 3b. Введение путем конъюгации ATF1 S.bayanus и S.cerevisiae в штамм Paracoccus, способный продуцировать зеаксантин.

Плазмида pMB6975 (контрольная плазмида pRK415) и плазмиды pMB6976, pMB6977, pMB6978 и pMB6979, несущие разные гены ATF1, были трансформированы в штамм E.coli S17-1 для получения штаммов MB7706, MB7007, MB7708, MB7709 и MB7710. Штамм E.coli S17-1 является мобилизационным хозяином, содержащим в своей хромосоме транспортные гены. Вектор pRK415 используется в качестве экспрессионной плазмиды и несет транспортные гены, необходимые для его переноса в Paracoccus. Плазмиды pMB6975-pMB6979 были по отдельности введены в штамм Paracoccussp. R114/pBBR-K-mev-op-R114-PcrtE-crtE$_{114}$ (Rif®) путем конъюгации со штаммами E.coli MB7706-MB7710, после чего проводилась селекция на среде, содержащей 100 мг/л рифампицина и 2,5 мг/л тетрациклина. Созданные эксконъюганты Paracoccus были названы R114/pBBR-K-mev-op-R114-PcrtE-crtE$_{114}$+pMB7006, R114/pBBR-K-mev-op-R114-PcrtE-crtE$_{114}$+pMB7007, R114/pBBR-K-mev-op-R114-PcrtE-crtE$_{114}$+pMB7008, R114/pBBR-K-mev-op-R114-PcrtE-crtE$_{114}$+pMB7009 и R114/pBBR-K-mev-op-R114-PcrtE-crtE$_{114}$+pMB7010.

Шесть эксконъюгантов Paracoccus, несущих разные гены ATF1, и шесть эксконъюгантов, несущих контрольную плазмиду, отбирали и культивировали в среде F (10 г/л триптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 30 г/л NaCl, 10 г/л D-глюкозы, 5 г/л $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, pH 7,0) при 28°C на качалке при 200 об/мин в течение 24 ч и анализировали на продукцию каротиноидов. Собирали один миллилитр бульона, центрифугировали, и осадок клеток экстрагировали для извлечения каротиноидов, как описано для образцов Yarrowia lipolytica. Все штаммы Paracoccus, несущие оптимизированные и неоптимизированные гены ATF1 S.bayanus и S.cerevisiae, продуцировали ацетилированные зеаксантин и β-криптоксантин в дополнение к свободному зеаксантину, β-криптоксантину и каротинам. Контрольный штамм, R114/pBBR-K-mev-op-R114-PcrtE-crtE$_{114}$+pMB7006, не содержащий ATF1, не продуцировал ацетилированный зеаксантин или ацетилированный β-криптоксантин.

Два типичных эксконъюганта Paracoccus, R114/pBBR-K-mev-op-R114-PcrtE-crtE$_{114}$+1 pMB7008-1 и R114/pBBR-K-mev-op-R114-PcrtE-crtE$_{114}$+pMB7010-9, несущие ген ATF1 дикого типа и оптимизированный по кодонам ген ATF1 S.cerevisiae соответственно, были выбраны для более детального анализа и сравнения с контрольным штаммом R114/pBBR-K-mev-op-R114-PcrtE-crtE$_{114}$+pMB7006-10. Штаммы выращивали в среде F, как описано выше. Собирали по 500 мкл бульона и лиофилизировали в течение 48 ч. Каротиноиды были экстрагированы и проанализированы, как описано для образцов Yarrowia lipolytica. Фиг. 5 показывает, что штаммы, несущие ATF1, продуцировали около 10% моноацетилированного и около 4% диацетилированного зеаксантина (в процентах от общего содержания зеаксантина). Штаммы, несущие ATF1, также продуцировали больше 74 и 65% гидроксилированных продуктов (ацетилированный и свободный зеаксантин и β-криптоксантин), чем контрольный штамм (на 55 и 43% больше зеаксантина).

Пример 4. Экстракция каротиноидов из клеток Yarrowia lipolitica и Paracoccus и количественное определение их продукции с помощью ВЭЖХ.

Тестирование во встряхиваемых колбах и анализ каротиноидов в полученных штаммах проводили в

соответствии с методами, описанными ранее в патенте США № 7851199 B2.

Для количественного определения ацетилированных каротиноидов из Yarrowia и Paracoccus с помощью ВЭЖХ и ВЭЖХ в комбинации с масс-спектрометрией с диодно-матричным детектированием (HPLCDADMS) были использованы следующие методы:

Нормально-фазовый метод определения каротиноидов.

Для внесения образцов в колонку использовали насос для введения двухкомпонентных систем Waters 1525, соединенный с автоматическим пробоотборником Waters717. Для разделения каротиноидов использовали колонку PhenomenexLuna 3μSilica (2), 150×4,6 мм с набором Security Silica Guard Column Kit. Синтетические образцы каротиноидов, приобретенные в Carote Nature (GmbH, ImBudler 8 CH-4419 Lupsingen, Швейцария) или полученные от DSM Nutritional Products Ltd., были использованы в качестве эталонных стандартов. Ацетилированные соединения астаксантина и зеаксантина были синтезированы на основе экспериментов, описанных в Kaewkoola and Krisnangkura, Chem. Phys. Lipids. 2010, 163: 685-688 и Kaewkool et al., Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2009, 11: 474-480. Примерно по 100 мг/л каротиноида растворяли в этилацетате и добавляли избыток основания: либо гидроксида натрия, либо гидроксида калия. Образцы выдерживали в темноте при комнатной температуре в течение 1-5 дней, периодически проводя анализ. Синтезированные ацетилированные компоненты были затем использованы в качестве маркеров времени удерживания, но количественное определение проводили на основе неацетилированного соединения. Все другие ацетилированные соединения, за исключением зеаксантина и астаксантина, были идентифицированы только по спектральным характеристикам в УФ-свете. Подвижная фаза состояла из 1000 мл гексана, 30 мл изопропанола и 0,1 мл уксусной кислоты для родственных астаксантину соединений или из 1000 мл гексана, 60 мл изопропанола и 0,1 мл уксусной кислоты для родственных зеаксантину соединений. Скорость тока для каждого эксперимента составляла 0,6 мл/мин. Температура колонки была равна окружающей температуре. Объем вносимого образца составлял 20 мкл. В качестве детектора использовался фотод и одноматричный детектор с диапазоном детекции от 210 до 600 нм.

Типичная хроматограмма для родственных зеаксантину соединений, полученная с использованием описанного выше метода, приведена на фиг. 6:

1 - каротины,

2 - ацетилированный β-криптоксантин,

3 - диацетилированный зеаксантин,

4 - β-криптоксантин,

5 - моно-ацетилированный зеаксантин,

6 - зеаксантин.

Типичная хроматограмма для родственных астаксантину соединений, полученная с использованием описанного выше метода, приведена на фиг. 7:

1 - каротины,

2 - диацетилированный адониксантин,

3 - моноацетилированный адониксантин,

4 - диацетилированный астаксантин,

5 - адонирубин,

6 - моноацетилированный астаксантин,

7 - астаксантин.

Метод ВЭЖХ в комбинации с масс-спектрометрией с диодно-матричным детектированием (HPLCDADMS).

Для определения ацетилированного зеаксантина методом HPLCDADMS образцы ресуспендировали в ледяном растворителе для экстракции (50/50 об./об. смесь гексана и этилацетата, содержащая 0,01% бутил-гидрокситолуола (BHT). Для разделения каротиноидов при 25°C использовали систему Alliance 2795 HPLC (Waters) с колонкой WatersX-Bridge C18 (3,5 мкм, 2,1×50 мм) и с колонкой ThermoBasic 8 guard (2,1×10 мм). В качестве стандартов были использованы аутентичные образцы каротиноидов. Подвижная фаза и скорости тока приведены ниже (растворитель A=этилацетат; растворитель B=вода; растворитель C=метанол; растворитель D=ацетонитрил). Объем инъекции составлял 10 мкл. В качестве детектора использовался фотодиодный детектор Waters996 в тандеме с масс-спектрометром Micro Mass Quattro Micro. Масс-спектрометр работал в режиме настроек по умолчанию для мониторинга одиночных ионов в режиме положительных ионов. Напряжение конуса составляло 35 В. Время удерживания зеаксантина составило 1,09 мин, максимум поглощения при 450 нм соответствовал моноизотопу с массой 569,4 в режиме положительных ионов. Время удерживания моноацетилированного зеаксантина составляло 2,68 мин, максимум поглощения при 450 нм соответствовал моноизотопу с массой 611,4 в режиме положительных ионов. Время удерживания диацетилированного зеаксантина составило 3,08 мин, максимум поглощения при 450 нм соответствовал моноизотопу с массой 653,4 в режиме положительных ионов. Время удерживания для других каротиноидов было следующим: β-криптоксантин - 3,2 мин, ликопин - 3,6 мин, γ-каротин - 3,8 мин и β-каротин - 3,95 мин.

Скорость тока и градиент подвижной фазы						
Время (мин)	Скорость тока (мл/мин)	% A	% B	% C	% D	Кривая
0,0	0,5	0	20	0	80	6
3,0	1,0	20	0	0	80	6
4,5	1,0	80	0	20	0	6
5,0	0,9	0	0	100	0	6
6,0	0,9	0	0	100	0	6
6,5	0,9	0	20	0	80	6
7,0	0,5	0	20	0	80	6

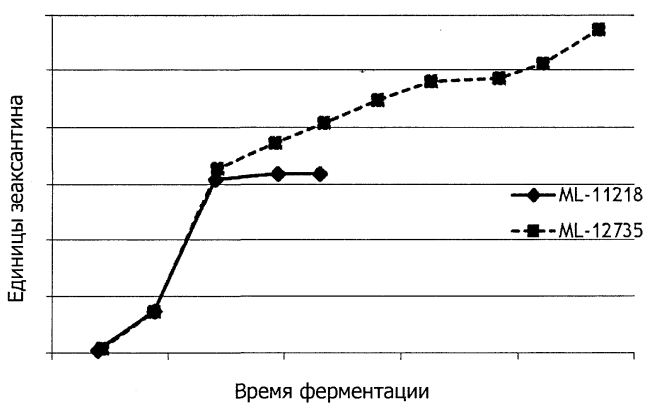
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Трансформированный микроорганизм Yarrowia lipolytica, способный продуцировать ацетилированные каротиноиды, в котором экспрессирован по меньшей мере один гетерологичный полипептид с ацетилтрансферазной активностью, которая обеспечивает превращение молекулы каротиноида, содержащей (a) по меньшей мере одно β-иононное кольцо по меньшей мере с одной связанной с кольцом гидроксильной группой, или (b) по меньшей мере одно ε-иононное кольцо по меньшей мере с одной связанной с кольцом гидроксильной группой, или (c) по меньшей мере одно β-иононное кольцо по меньшей мере с одной связанной с кольцом гидроксильной группой и по меньшей мере одно ε-иононное кольцо с по меньшей мере одной связанной с кольцом гидроксильной группой, в соответствующую частично или полностью ацетилированную молекулу каротиноида, причем указанный микроорганизм трансформирован нуклеиновой кислотой или конструкцией нуклеиновой кислоты, включающей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 13, которая функционально связана с одним или более регуляторным сигналом, и кодирует указанный гетерологичный полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 14.

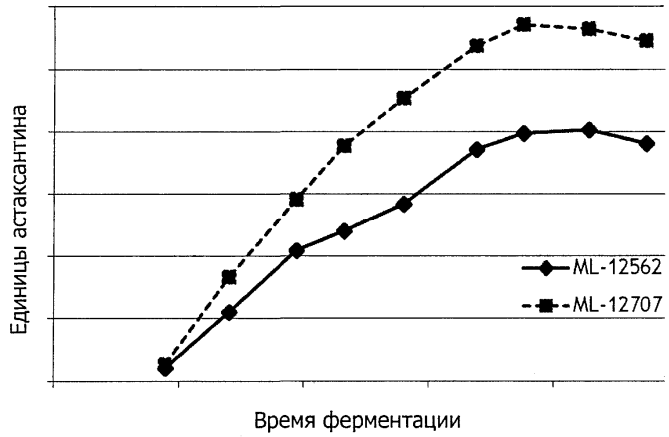
2. Трансформированный микроорганизм Paracoccus zeaxanthinifaciens, способный продуцировать ацетилированные каротиноиды, в котором экспрессирован по меньшей мере один гетерологичный полипептид с ацетилтрансферазной активностью, которая обеспечивает превращение молекулы каротиноида, содержащей (a) по меньшей мере одно β-иононное кольцо по меньшей мере с одной связанной с кольцом гидроксильной группой, или (b) по меньшей мере одно ε-иононное кольцо по меньшей мере с одной связанной с кольцом гидроксильной группой, или (c) по меньшей мере одно β-иононное кольцо по меньшей мере с одной связанной с кольцом гидроксильной группой и по меньшей мере одно ε-иононное кольцо по меньшей мере с одной связанной с кольцом гидроксильной группой, в соответствующую частично или полностью ацетилированную молекулу каротиноида, причем указанный микроорганизм трансформирован нуклеиновой кислотой или конструкцией нуклеиновой кислоты, включающей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 13, которая функционально связана с одним или более регуляторным сигналом, и кодирует указанный гетерологичный полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 14.

3. Трансформированный микроорганизм по п.1 или 2, в котором указанный гетерологичный полипептид обладает ферментативной активностью по превращению зеаксантина, астаксантина, лютеина и β-криптоксантина в зеаксантинмоно- или диацетат, астаксантинмоно- или диацетат, лютеинмоно- или диацетат и β-криптоксантинацетат соответственно.

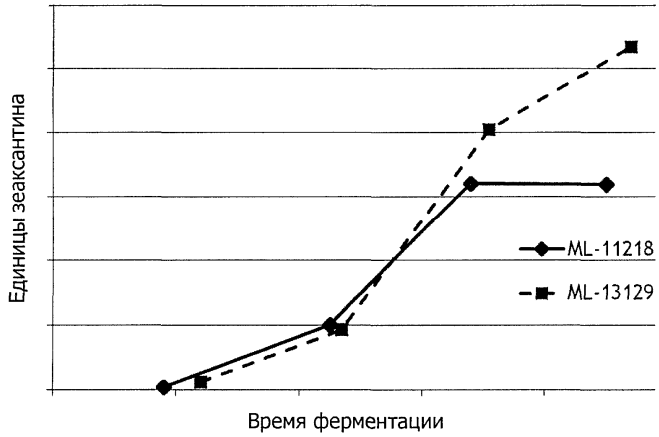
4. Применение трансформированного микроорганизма по любому из пп.1-3 для производства ацетилированных каротиноидов.



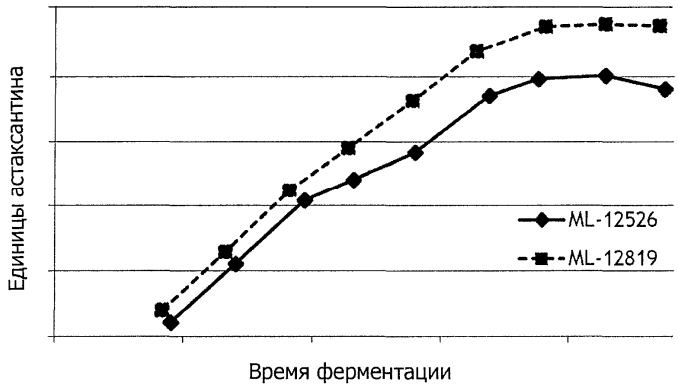
Фиг. 1



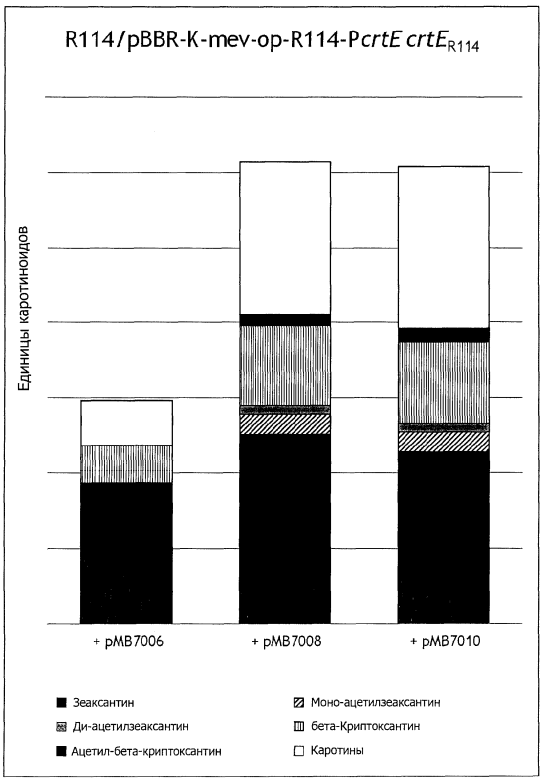
Фиг. 2



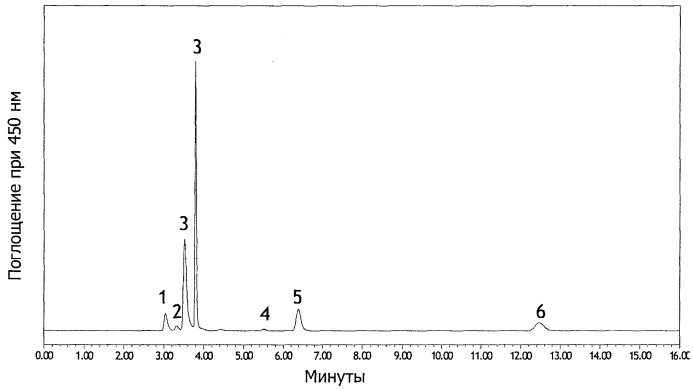
Фиг. 3 (Зеаксантин)



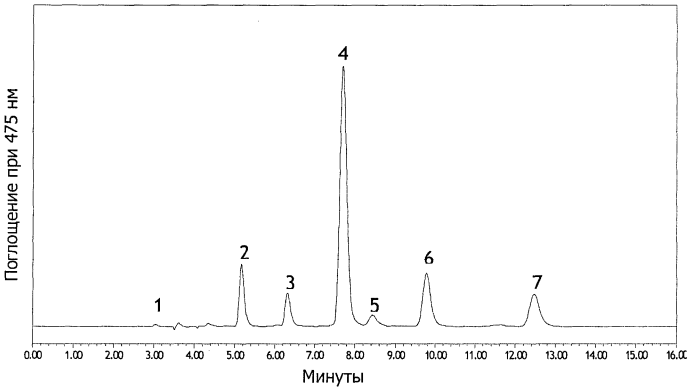
Фиг. 4 (Астаксантин)



Фиг. 5



Фиг. 6 (Зеаксантин)



Фиг. 7 (Астаксантин)