

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202191822 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.11.16

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

(22) Дата подачи заявки
2019.12.30

(54) НОВЫЕ АЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ

(31) 01616/18

(32) 2018.12.31

(33) CH

(86) PCT/EP2019/087183

(87) WO 2020/141168 2020.07.09

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

(72) Изобретатель:

Хьюстон Питер Луис, Де Йонг Рене
Марсель, Вервал Рене, Виас Вальмик
Канубхай, МакМэхон Дженна,
Симбор-Награбска Анна (CH)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Изобретение касается получения ретинилацетата, получаемого путем ферментативного превращения ретинола, причем данный процесс включает применение модифицированных ферментов с улучшенной активностью.

202191822

A1

A1

202191822

НОВЫЕ АЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ

Настоящее изобретение касается получения ретинилацетата, получаемого путем ферментативного превращения ретинола, причем данный процесс включает применение модифицированных ферментов с улучшенной активностью.

Ретинилацетат является важным промежуточным продуктом или предшественником для получения ретиноидов, в частности таких, как витамин А. Ретиноиды, включая витамин А, являются одним из очень важных и незаменимых нутриентов человека, которые должны поступать с пищей. Ретиноиды способствуют хорошему самочувствию человека, в том числе в отношении зрения, иммунной системы и роста.

Современные методы химического получения ретиноидов, особенно витамина А и его предшественников, имеют некоторые нежелательные характеристики, такие, напр., как высокое потребление энергии, сложные стадии очистки и/или нежелательные побочные продукты. Поэтому за последние десятилетия были исследованы и другие подходы к производству ретиноидов, особенно витамина А и его предшественников, включающие стадии микробиологического превращения, которые были бы более экономичными, а также экологичными.

В общем, биологические системы, которые вырабатывают ретиноиды, не подходят для использования в промышленности/или вырабатывают соединения на таком низком уровне, что их выделение в промышленном масштабе не представляет экономического интереса. Этому есть несколько причин, включая нестабильность ретиноидов в таких биологических системах или относительно высокую продукцию побочных продуктов.

Ранее сообщалось об ацетилировании таких каротиноидов, напр., как астаксантин или зеаксантин, под действием ATF1 из *Saccharomyces bayanus* (WO 2014/096992), причем ацетилирование, к примеру, зеаксантина составляет вплоть до 90%. Однако ферменты ацетилтрансферазы обычно обладают различной субстратной специфичностью для разных спиртовых субстратов, которая определяется локальным структурным окружением спиртовой функциональной группы в той молекуле, которая подлежит ацетилированию. Например, гидроксильная группа, подлежащая ацетилированию в таких каротиноидах как зеаксантин, располагается в кольцевой структуре β -иона, тогда как гидроксильная группа, подлежащая ацетилированию в ретиноле, располагается не в кольцевой структуре иона, а на другом конце, на атоме углерода CH_2 на конце полиеновой цепи молекулы. Из-за такого различного локального молекулярного контекста ацетилируемой гидроксигруппы очень трудно делать прогнозы об ацетилировании ретинолов на основе

данных по ацетилированию каротиноидов: как видно из Примера 2, при использовании ATF1 из *S. bayanus* получали только примерно 10% ретинилацетата по сравнению с почти 90% при ацетилировании зеаксантина в качестве субстрата.

Неожиданно мы обнаружили, что модификация некоторых аминокислот в ацетилтрансферазах, в частности ATF1, может усиливать ацетилирование ретиноидов, особенно образование ретинилацетата, давая такие показатели конверсии, которые повышены по меньшей мере в 0,2 раза, как-то в пределах от 0,2 до 4 раз и более по сравнению с соответствующим диким типом, в частности, с образованием ретинилацетата в пределах от по меньшей мере 50% до 90% от общего количества ретиноидов, получаемых при выращивании соответствующих клеток-хозяев на глюкозе.

В частности, настоящим изобретением предусмотрены модифицированные ферменты, участвующие в ацетилировании ретинола в ретинилацетат, в частности грибковые ферменты, содержащие одну или несколько модификаций типа аминокислотных замен в последовательности, которая по меньшей мере на 20%, напр., на 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 97, 98, 99% или на 100% идентична SEQ ID NO:1, а данная одна или несколько аминокислотных замен располагаются 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 по SEQ ID NO:1.

Применение такого модифицированного фермента в процессе получения ретиноидов, в котором такой модифицированный фермент экспрессируется, в частности, гетерологически экспрессируется в подходящих клетках-хозяевах, в частности, в грибковых клетках-хозяевах, способных вырабатывать ретинол, ведет к повышению уровня ретинилацетата по меньшей мере в 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,2, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25 раз от общего количества ретиноидов, присутствующих в/вырабатываемых модифицированными клетками-хозяевами, по сравнению с немодифицированными клетками-хозяевами, при ферментации с глюкозой в качестве источника углерода, как-то, напр., при процессе с подпиткой в течение 80, 90, 100, 110, 120, 130 ч при подходящих условиях культивирования.

Более того, вне ожидания, при экспрессии таких модифицированных ацетилтрансфераз, в частности ATF1, в продуцирующих ретинол клетках-хозяевах, особенно грибковых клетках-хозяевах, может повышаться общее количество ретиноидов, вырабатываемых данными клетками-хозяевами, причем повышение составляет по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 6 раз больше ретиноидов по сравнению с клетками-хозяевами,

культивируемыми в тех же условиях, но экспрессирующими соответствующие ферменты дикого типа или немодифицированные ферменты, как определено здесь, как-то, напр., при ферментации с подпиткой на глюкозе в качестве источника углерода, в частности, при ферментации с подпиткой, напр., 80, 90, 100, 110, 120, 130 ч в подходящих условиях культивирования.

Термины модифицированная “ацетилтрансфераза”, “ретинол-ацетилирующий фермент”, “фермент с активностью ацетилирования ретинола”, “ATF” или “ATF1” применяются здесь взаимозаменяемо и относятся к ферментам класса EC [EC 2.3.1.84], способным катализировать превращение ретинола в ретинилацетат, в частности, по меньшей мере от 50 до 90% в ацетилированной форме от общего количества ретиноидов.

Подходящие ферменты, которые можно использовать для получения модифицированных ATF по настоящему изобретению, можно получить из грибковых ферментов, содержащих сильно консервативную частичную аминокислотную последовательность из по меньшей мере 7 аминокислотных остатков, выбранных из [NDEHCS]-H-x(3)-D-[GA] (мотивы приводятся в синтаксисе Prosite, как определено в https://prosite.expasy.org/scanprosite/scanprosite_doc.html), где “х” означает произвольную аминокислоту, а центральный гистидин входит в состав связывающего кармана фермента, предпочтительно при этом мотив из 7 аминокислот выбран из [NDE]-H-x(3)-D-[GA], более предпочтительно из [ND]-H-x(3)-D-[GA], наиболее предпочтительно из N-H-x(3)-D-[GA], что соответствует положениям от N218 до G224 в полипептиде по SEQ ID NO:1. Примеры таких немодифицированных ферментов могут быть выбраны из дрожжей типа *Lachancea*, *Saccharomyces* или *Wickerhamomyces*, особенно из *L. mirantina*, *L. fermentati*, *S. bayanus* или *W. anomalus*, как-то, напр., LmATF1 по SEQ ID NO:1, SbATF1 по SEQ ID NO:5, LfATF1 по SEQ ID NO:9, LffATF1 по SEQ ID NO:7, Wa1ATF1 по SEQ ID NO:11 или Wa3ATF1 по SEQ ID NO:13.

Модифицированные ATF, как определено здесь, способны превращать ретинол в ретинилацетат, особенно с показателем конверсии не менее 50%, а предпочтительно 52, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95 или даже 100% (от общего количества ретиноидов, вырабатываемых данными клетками-хозяевами) по образованию ретинилацетата, как-то, напр., при получении посредством экспрессии модифицированной LmATF1 при подходящих условиях культивирования, включая, без ограничения, культивирование на глюкозе, галактозе или ксилозе. Предпочтительно модифицированная изоформа представляет собой ATF1 типа полипептида, который по меньшей мере на 20% идентичен SEQ ID NO: 1 и содержит одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, как определено здесь.

Ферменты, как определено здесь, применяются для превращения ретинола в ретинилацетат, причем субстрат (т.е. ретинол) может представлять собой цис-, транс- или смесь цис-/транс-ретинола в любом возможном соотношении. Предпочтительно смесь ретинолов, используемая в качестве субстрата, имеет высокое содержание транс-ретинола, как-то, напр., от 65 до 98% транс-ретинола от общего количество ретинолов в клетках-хозяевах. При ацетилировании такой смеси ретинолов, содержащей от 65 до 98% транс-ретинола, образуется ретинилацетат с такой же долей транс-/цис-ретинилацетата от общего количества ретинилацетата, вырабатываемого клетками-хозяевами.

Итак, настоящее изобретение касается превращения ретинола в ретинилацетат с помощью подходящих клеток-хозяев, как определено здесь, содержащих и экспрессирующих модифицированный фермент, как определено здесь, причем ретинол представляет собой смесь транс- и цис-ретинола, а содержание транс-ретинола находится в пределах от 65 до 98% транс-ретинола от общего количества ретинола.

Термины “превращение”, “ферментативное превращение”, “ацетилирование” или “ферментативное ацетилирование” в связи с ферментативным катализом ретинола применяются здесь взаимозаменяемо и относятся к действию модифицированной ATF, в частности фермента ATF1, как определено здесь.

Термин “степень конверсии” означает содержание ацетилированных форм, то есть соотношение ацетилированных форм к неацетилированным формам соединения, в частности, соотношение ацетилированных форм ретинола типа ретинилацетата к неацетилированным ретиноидам, присутствующим в соответствующих клетках-хозяевах, причем ацетилирование происходит под действием модифицированных ферментов ATF1 по настоящему изобретению.

Подходящие клетки-хозяева по настоящему изобретению включают грибковые клетки-хозяева. В настоящем изобретении термин “грибковые клетки-хозяева”, в частности, включает дрожжевые клетки, причем эти клетки вырабатывают ретинол, в частности, вырабатывают ретинилацетат, как-то грибковые клетки-хозяева, вырабатывающие ретинилацетат, включая, без ограничения, *Yarrowia* или *Saccharomyces*, напр., типа *Yarrowia lipolytica* или *Saccharomyces cerevisiae*.

Модифицированный фермент ATF может применяться в выделенном виде (напр., в бесклеточной системе) или же может экспрессироваться в подходящих клетках-хозяевах, напр., типа вырабатывающих ретинол клеток-хозяев, в частности, в грибковых клетках-хозяевах, как определено здесь. Ферменты могут экспрессироваться как эндогенные ферменты или как гетерологичные ферменты. Предпочтительно модифицированные ферменты, как описано здесь, вводятся и экспрессируются как гетерологичные ферменты

в подходящих клетках-хозяевах, напр., типа вырабатывающих ретинол клеток-хозяев, в частности, в грибковых клетках-хозяевах, как определено здесь.

В одном воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 68 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает треонин в данном положении, как-то, напр., при замене глутамина на треонин (Q68T). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalus* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере от 55 до 70% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь, как-то, в частности, с одной или несколькими аминокислотными заменами в положениях, соответствующих остаткам 69 и/или 407 и/или 409 и/или 480 в полипептиде по SEQ ID NO:1.

В одном воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 69 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает аспарагин, серин или аланин в данном положении, как-то, напр., при замене гистидина на аспарагин (H69N), серин (H69S) или аланин (H69A), предпочтительно H69A. Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalus* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере от 60 до 84% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь, как-то, в частности, с одной или несколькими аминокислотными заменами в положениях, соответствующих остаткам 72 и/или 311 и/или 334 и/или 407 и/или 409 и/или 480 и/или 484 в полипептиде по SEQ ID NO:1.

В другом воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 72 в

полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает аспарагин или лизин в данном положении, как-то, напр., при замене глутамина на аспарагин (Q72N) или лизин (Q72K). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalus* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере от 55 до 81% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь, как-то, в частности, с одной или несколькими аминокислотными заменами в положениях, соответствующих остаткам 407 и/или 409 и/или 480 в полипептиде по SEQ ID NO:1.

В другом воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 73 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает лейцин в данном положении, как-то, напр., при замене изолейцина на лейцин (I73L). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalus* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере 57% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь.

В одном воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 171 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает лизин или аспарагин в данном положении, как-то, напр., при замене глицина на лизин (G171K) или аспарагин (G171N). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalus* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по

меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере от 55 до 59% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь.

В следующем воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 172 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает глицин в данном положении, как-то, напр., при замене аспарагина на глицин (N172G). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalous* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере 53% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь.

В другом воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 174 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает изолейцин в данном положении, как-то, напр., при замене валина на лейцин (V174I). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalous* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере 57% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь.

В другом воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 176 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает аланин или глицин в данном положении, как-то, напр., при замене серина на аланин (S176A) или глицин (S176G). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalous* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в

процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере от 55 до 57% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь.

В одном воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 178 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает валин в данном положении, как-то, напр., при замене лейцина на валин (L178V). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalus* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере 53% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь.

В одном воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 291 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает серин или глицин в данном положении, как-то, напр., при замене аланина на серин (A291S) или глицин (A291G). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalus* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере от 51 до 52% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь.

В другом воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 292 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает аланин, серин или аспарагин в данном положении, как-то, напр., при замене глицина на аланин (G292A), серин (G292S) или аспарагин (G292N). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей

типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalus* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере от 53 до 57% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь.

В другом воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 294 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает лейцин или валин в данном положении, как-то, напр., при замене фенилаланина на лейцин (F294L) или валин (F294V). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalus* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере от 54 до 58% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь.

В одном воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 301 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает фенилаланин в данном положении, как-то, напр., при замене тирозина на фенилаланин (Y301F). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalus* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере 56% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь.

В одном воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 307 в

полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает изолейцин в данном положении, как-то, напр., при замене пролина на изолейцин (P307I). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalus* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере 55% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь.

В следующем воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 308 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает валин в данном положении, как-то, напр., при замене треонина на валин (T308V). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalus* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере 56% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь.

В одном воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 311 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает метионин или изолейцин в данном положении, как-то, напр., при замене треонина на метионин (T311M) или изолейцин (T311I). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalus* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере от 55 до 82% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь, как-то, в частности,

с одной или несколькими аминокислотными заменами в положениях, соответствующих остаткам 407 и/или 409 и/или 480 в полипептиде по SEQ ID NO:1.

В другом воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 312 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает аланин в данном положении, как-то, напр., при замене серина на аланин (S312A). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalous* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере 54% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь.

В другом воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 320 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает аспарагин в данном положении, как-то, напр., при замене гистидина на аспарагин (H320N). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalous* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере 57% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь.

В другом воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 322 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает валин или фенилаланин в данном положении, как-то, напр., при замене тирозина на валин (Y322V) или фенилаланин (Y322F). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalous* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в

частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере от 56 до 57% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь.

В одном предпочтительном воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 334 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает лейцин в данном положении, как-то, напр., при замене валина на лейцин (V334L). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalus* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере от 63 до 78% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь, как-то, в частности, с одной или несколькими аминокислотными заменами в положениях, соответствующих остаткам 407 и/или 409 и/или 480 в полипептиде по SEQ ID NO:1.

В другом воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 362 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает аланин в данном положении, как-то, напр., при замене серина на аланин (S362A). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalus* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере 54% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь.

В другом воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 405 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает аланин в данном положении, как-то, напр., при замене серина на аланин (S405A). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalus* или *S.*

bayanus, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере 61% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь.

В одном предпочтительном воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 407 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает изолейцин в данном положении, как-то, напр., при замене валина на изолейцин (V407I). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalus* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере от 56 до 84% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь, как-то, в частности, с одной или несколькими аминокислотными заменами в положениях, соответствующих остаткам 409 и/или 480 и/или 484 в полипептиде по SEQ ID NO:1.

В другом предпочтительном воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 409 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает аланин в данном положении, как-то, напр., при замене глицина на аланин (G409A). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalus* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina* или *W. anomalus*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере от 63 до 84% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. По сравнению с соответствующим процессом с использованием соответствующего немодифицированного фермента ATF1, повышение содержания

ретирилацетата от общего количества ретиноидов составляет по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 70, 100, 200, 300% и более. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь, как-то, в частности, с одной или несколькими аминокислотными заменами в положениях, соответствующих остаткам 480 и/или 484 в полипептиде по SEQ ID NO:1.

В следующем предпочтительном воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 480 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает глутаминовую кислоту, лизин, метионин, фенилаланин или глутамин в данном положении, как-то, напр., при замене серина на глутаминовую кислоту (S480E), лизин (S480L), метионин (S480M), фенилаланин (S480F) или глутамин (S480Q). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalus* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina* или *W. anomalus*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретирилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере от 52 до 84% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. По сравнению с соответствующим процессом с использованием соответствующего немодифицированного фермента ATF1, повышение содержания ретирилацетата от общего количества ретиноидов составляет по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70% и более. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь, как-то, в частности, по меньшей мере с одной аминокислотной заменой в положении, соответствующем остатку 484 в полипептиде по SEQ ID NO:1.

В следующем воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 483 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает валин в данном положении, как-то, напр., при замене лейцина на валин (L483V). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalus* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретирилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере 55% от общего

количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь.

В следующем воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 484 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает лейцин в данном положении, как-то, напр., при замене изолейцина на лейцин (I484L). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalus* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере от 58 до 84% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь.

В одном воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 490 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает изолейцин в данном положении, как-то, напр., при замене валина на изолейцин (V490I). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalus* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере 56% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь.

В одном воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 492 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает валин в данном положении, как-то, напр., при замене аспарагиновой кислоты на валин (D492V). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalus* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола

в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере 54% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь.

В другом воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 520 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает аланин в данном положении, как-то, напр., при замене изолейцина на аланин (I520A). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalus* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере 54% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь.

В другом воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 521 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает аланин или валин в данном положении, как-то, напр., при замене цистеина на аланин (C521A) или валин (C521V). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalus* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере от 54 до 58% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь.

В одном воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 522 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает серин или треонин в данном положении, как-то, напр., при замене аланина на серин (A522S) или треонин (A522T). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalus* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию

вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере от 55 до 59% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь.

В одном воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 524 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает аспарагин или серин в данном положении, как-то, напр., при замене аспарагиновой кислоты на аспарагин (D524N) или серин (D524S). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalus* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере от 52 до 58% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь.

В следующем воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 525 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает валин, изолейцин или аргинин в данном положении, как-то, напр., при замене глутамина на валин (Q525V), изолейцин (Q525I) или аргинин (Q525R). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalus* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере от 56 до 67% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь.

В следующем воплощении модифицированный фермент ATF1, как определено здесь, включает аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 526 в полипептиде по SEQ ID NO:1, которая дает серин в данном положении, как-то, напр., при

замене глицина на серин (G526S).). Такой модифицированный фермент может происходить из дрожжей типа, напр., *L. mirantina*, *L. fermentati*, *W. anomalus* или *S. bayanus*, предпочтительно из *L. mirantina*. При использовании такого модифицированного фермента, содержащего данную мутацию вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, можно получить степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере 55% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах. Кроме того, эта мутация может комбинироваться с 1, 2, 3, 4 и более мутациями, как определено здесь.

Особенно полезными для целей настоящего изобретения являются модифицированные ферменты ATF1, как определено здесь, включающие комбинации из по меньшей мере 2 мутаций, то есть комбинации из по меньшей мере 2 аминокислотных замен в положениях, соответствующих остаткам G409A и S480L или S480Q, G409A и Q72K, G409A и V334L, G409A и T311I, G409A и H69N, H69S или H69A, G409A и V407I в полипептиде по SEQ ID NO: 1, вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, для применения в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, получая степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере от 52 до 74% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах, или комбинации из по меньшей мере 2 аминокислотных замен в положениях, соответствующих остаткам V407I и T311I, V407I и H69N, H69A или H69S, V407I и S480L или S480Q, V407I и I484L, V407I и V334L либо V407I и Q72K в полипептиде по SEQ ID NO:1, или комбинации из по меньшей мере 2 аминокислотных замен в положениях, соответствующих остаткам S480Q и T311I, S480Q и Q72K, S480Q и H69N, H69S или H69A, S480Q и Q68T, S480Q и I484I либо S480Q и V334L в полипептиде по SEQ ID NO:1.

Кроме того, предусмотрены комбинации из по меньшей мере 3 мутаций, то есть комбинации из по меньшей мере 3 аминокислотных замен в положениях, соответствующих остаткам S480Q, V407I и I484L, S480Q, V407I и V334L, S480Q, G409A и Q68T, S480Q, V407I и H69N, S480Q, V407I и Q72K, S480Q, V407I и H69S, S480Q, G409A и H69A, S480Q, G409A и H69N, S480Q, G409A и I484L, S480Q, V407I и Q68T, S480Q, V407I и H69A, S480Q, V407I и T311I, G409A, V407I и H69S, G409A, V407I и S480L, G409A, V407I и Q68T, G409A, V407I и Q72K, G409A, V407I и I484L, G409A, V407I и H69A, G409A, V407I и H69N, G409A, V407I и T311I или G409A, V407I и V334L в полипептиде по SEQ ID NO:1, вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, для применения в процессе ферментации с подходящим

источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, получая степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере от 58 до 71% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах.

В другом воплощении предусмотрены комбинации из по меньшей мере 4 мутаций, то есть комбинации из по меньшей мере 4 аминокислотных замен в положениях, соответствующих остаткам S480Q, G409A, V407I и I484L, S480Q, G409A, V407I и Q72K, S480Q, G409A, V407I и Q68T, S480L, G409A, V407I и T311I, S480Q, G409A, V407I и I484L, S480Q, G409A, V407I и H69N, S480Q, G409A, V407I и H69A, S480Q, G409A, V407I и T311I, S480Q, G409A, V407I и H69S или S480Q, G409A, V407I и V334L в полипептиде по SEQ ID NO:1, вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, для применения в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, получая степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере от 57 до 78% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах.

В следующем воплощении предусмотрены модифицированные ферменты, включающие комбинации из по меньшей мере 5 мутаций, то есть комбинации из по меньшей мере 5 аминокислотных замен в положениях, соответствующих остаткам S480Q, G409A, V407I, H69S и Q72K, S480Q, G409A, V407I, H69N и T311I, S480Q, G409A, V407I, H69N и Q72K, S480Q, G409A, V407I, H69A и Q68T, S480Q, G409A, V407I, H69N и V334L, S480Q, G409A, V407I, H69N и I484L, S480Q, G409A, V407I, H69A и V334L, S480Q, G409A, V407I, H69A и Q72K, S480Q, G409A, V407I, H69A и T311I или S480Q, G409A, V407I, H69A и I484L в полипептиде по SEQ ID NO:1, вместе с мотивом из 7 аминокислот согласно N-H-x(3)-D-[GA], как определено здесь, для применения в процессе ферментации с подходящим источником углерода типа, напр., глюкозы, в частности, получая степень конверсии ретинола в ретинилацетат в пределах по меньшей мере 50%, как-то по меньшей мере от 56 до 84% от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах.

Клетки-хозяева, как описано здесь, способны превращать ретинол в ретинилацетат с показателями конверсии, которые повышаются по меньшей мере в 0,2 раза, напр., в пределах от 0,2 до 4 раз и более по сравнению с превращением с помощью соответствующего фермента дикого типа, в частности, с показателями конверсии по меньшей мере в 50%, предпочтительно 52, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95 или даже 100%, напр., в пределах 50-90% (от общего количества ретиноидов, вырабатываемых данными клетками-хозяевами) по образованию ретинилацетата, как-то, напр., при получении посредством экспрессии модифицированной LmATF1 при подходящих

условиях культивирования, включая, без ограничения, культивирование на глюкозе, галактозе или ксилозе и подходящие клетки-хозяева, как-то, напр., выбранные из грибковых клеток-хозяев, включая *Yarrowia* или *Saccharomyces*. Подходящие условия культивирования могут заключаться в ферментации с подпиткой, напр., в течение 80, 90, 100, 110, 120, 130 ч.

Модифицированные клетки-хозяева, как определено здесь, содержат одну или несколько копий модифицированных ATF, как определено здесь, причем предпочтительно эти ATF гетерологичны и экспрессируются в данных модифицированных клетках-хозяевах. Модификации для того, чтобы клетки-хозяева, как определено здесь, вырабатывали больше копий генов и/или белков, как-то, напр., больше копий модифицированных ATF с избирательностью в отношении образования ретинилацетата, как определено здесь, давая показатели конверсии по меньшей мере в 50% типа в пределах 50-90% от общего количества ретиноидов, вырабатываемых данными клетками-хозяевами по образованию ретинилацетата, как-то, напр., при получении посредством экспрессии модифицированной LmATF1 при подходящих условиях культивирования, включая, без ограничения, культивирование на глюкозе, галактозе или ксилозе, могут включать использование сильных промоторов, подходящих энхансеров транскрипции и/или трансляции или введение одной или нескольких копий гена в клетки-хозяева, продуцирующие ретинол, особенно в грибковые клетки-хозяева, что ведет к усилению накопления соответствующих ферментов в заданное время. Специалистам известно, какие методы применяются в зависимости от клеток-хозяев. Усиление или уменьшение экспрессии гена можно измерить различными методами, такими, напр., как методы Нозерн-, Саузерн- или Вестерн-блоттинга, известные в данной области.

Введение мутаций в нуклеиновые кислоты или аминокислоты, то есть мутагенез, может осуществляться разными способами, такими, к примеру, как случайный или сайт-направленный мутагенез, физическое повреждение под действием таких агентов, к примеру, как облучение, химическая обработка, или вставка генетического элемента. Специалистам известно, как вводятся мутации.

Итак, настоящим изобретением предусмотрены продуцирующие ретинол клетки-хозяева, предпочтительно грибковые клетки-хозяева, как описано здесь, содержащие экспрессирующие векторы или полинуклеотиды, кодирующие модифицированные ATF, особенно ферменты ATF1, как описано здесь, которые были встроены в хромосомную ДНК клеток-хозяев. Такие продуцирующие ретинол клетки-хозяева, в особенности грибковые клетки-хозяева, содержащие гетерологичные полинуклеотиды либо в

экспрессирующем векторе, либо встроенные в хромосомную ДНК, кодирующие модифицированные ATF, в частности ферменты ATF1, как описано здесь, называются рекомбинантными или модифицированными клетками-хозяевами. Продуцирующие ретинол клетки-хозяева, в частности грибковые клетки-хозяева, могут содержать одну или несколько копий гена, кодирующего модифицированные ATF, в частности ферменты ATF1, как определено здесь, напр., полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, которые по меньшей мере на 20% идентичны SEQ ID NO:1, содержащие одну или несколько аминокислотных замен, как определено здесь, вместе с мотивом из 7 аминокислот, как определено здесь, что ведет к гиперэкспрессии таких генов, кодирующих данные модифицированные ATF, в частности ферменты ATF1, как определено здесь. Усиление экспрессии генов можно измерить различными методами, такими, напр., как методы Нозерн-, Саузерн- или Вестерн-блоттинга, известные в данной области.

На основе представленных здесь последовательностей, включающих мотив из 7 аминокислот, и предпочтения при ацетилировании ретинола (предпочтительно в виде транс-изоформы) в ретинилацетат (предпочтительно в виде транс-изоформы), в особенности с показателями конверсии по меньшей мере в 50%, предпочтительно 52, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95 или даже 100%, как-то в пределах 50-90% (от общего количества ретиноидов, вырабатываемых данными клетками-хозяевами) по образованию ретинилацетата, как-то, напр., при получении посредством экспрессии модифицированной LmATF1 при подходящих условиях культивирования, включая, без ограничения, культивирование на глюкозе, галактозе или ксилозе, можно легко определить другие подходящие гены, кодирующие полипептиды с активностью ацетилирования ретинола, как определено здесь, которые можно использовать для превращения ретинола в ретинилацетат.

Итак, настоящим изобретением предусмотрен способ идентификации новых ацетилирующих ферментов, в котором используются полипептиды, содержащие частичную аминокислотную последовательность по меньшей мере из 7 аминокислотных остатков, выбранных из [NDEHCS]-H-x(3)-D-[GA], соответствующих положениям от N218 до G224 в полипептиде по SEQ ID NO:1 (мотив в синтаксисе Prosite), напр., типа полипептидов, по меньшей мере на 20%, как-то, напр., на 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 97, 98, 99% или до 100% идентичных известным последовательностям типа SEQ ID NO:1, в качестве зонда в процессе скрининга новых ферментов AFT, в особенности ферментов ATF1 с предпочтением на образование ретинилацетата в результате превращения ретинола, которые можно использовать для введения одной или нескольких аминокислотных замен, как описано здесь, для получения

модифицированных ферментов ATF1 с показателями конверсии, которые повышаются по меньшей мере в 0,2 раза типа в пределах от 0,2 до 4 раз и более по сравнению с соответствующими ферментами ATF1 дикого типа, в частности, с показателями конверсии по меньшей мере в 50%, предпочтительно 52, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95 или даже 100%, как-то в пределах 50-90% (от общего количества ретиноидов, вырабатываемых данными клетками-хозяевами) по образованию ретинилацетата, как-то, напр., при получении посредством экспрессии модифицированной LmATF1 при подходящих условиях культивирования, включая, без ограничения, культивирование на глюкозе, галактозе или ксилозе. Этот способ особенно применим для выявления предполагаемых грибковых, в том числе дрожжевых гомологов ATF1, характеризующихся мотивом из 7 аминокислот с центральным гистидином, входящим в состав связывающего кармана фермента, но проявляющих лишь слабую идентичность последовательностей типа всего лишь на 20-35% максимум по протоколу NEEDLE, как описано ниже.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ идентификации модифицированных ферментов ATF1, предпочтительно мембраносвязанных дрожжевых ферментов ATF1, содержащих частичную аминокислотную последовательность по меньшей мере из 7 аминокислотных остатков [NDEHCS]-H-x(3)-D-[GA], соответствующих положениям от N218 до G224 в полипептиде по SEQ ID NO:1 (мотив в синтаксисе Prosite), как определено здесь, который включает стадии:

(1) выравнивания различных мембраносвязанных дрожжевых ферментов ATF, включая, без ограничения, ферменты, происходящие из *Lanchancea*, *Wickerhamomyces* или *Saccharomyces*, как-то, напр., идентифицированные с помощью программы поиска BLAST в базах данных UNIREF/UNIPROT, с SEQ ID NO:1;

(2) идентификации соответствующих положений у гомологов ATF;

(3) введения одной или нескольких аминокислотных замен 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 по SEQ ID NO: 1; и

(4) скрининга на активность ацетилирования ретинола в продуцирующих ретинол клетках-хозяевах, предпочтительно выбранных из *Yarrowia* или *Saccharomyces*, предпочтительно с показателями конверсии по меньшей мере в 50-90% от общего количества ретиноидов, вырабатываемых данными клетками-хозяевами, по образованию

ретирилацетата.

В частности, настоящим изобретением предусмотрено применение таких новых модифицированных ATF, в частности ферментов ATF1, в способе получения ретирилацетата, при котором снижается образование ретириловых эфиров типа, напр., длинноцепочечных (LC) ацилов ретинола. Способ может выполняться с подходящими продуцирующими ретинол клетками-хозяевами, в особенности с грибковыми клетками-хозяевами, экспрессирующими такие модифицированные ATF, в частности, ферменты ATF1, причем предпочтительно гены, кодирующие данные модифицированные ферменты, экспрессируются гетерологично, т.е. они вводятся в данные клетки-хозяева. Ретирилацетат может далее превращаться в витамин А под действием (известных) подходящих химических или биотехнологических механизмов.

Так, в частности, настоящим изобретением предусмотрен способ получения смеси ретиноидов, содержащей ретирилацетат в соотношении по меньшей мере 50-90% от общего количества ретиноидов, вырабатываемых клетками-хозяевами, как-то, напр., при получении посредством экспрессии модифицированной LmATF1 при подходящих условиях культивирования, включая, без ограничения, культивирование на глюкозе, галактозе или ксилозе, – или же при этом по крайней мере содержание ретирилацетата повышается по меньшей мере в 0,2 раза, как-то в пределах от 0,2 до 4 раз и более по сравнению с использованием соответствующего немодифицированного фермента ATF1, включая, напр., содержание не менее 65% в виде транс-ретирилацетата за счет ферментативной активности модифицированного фермента ATF1, как определено здесь, который включает контактирование ретинола типа, напр., смеси ретинолов, содержащей транс- и цис-ретинол, предпочтительно с содержанием не менее 65-90% в виде транс-ретинола, с таким модифицированным ферментом ATF1, и необязательно выделение и/или очистку образовавшегося ретирилацетата из клеток-хозяев. В частности, изобретением предусмотрен способ получения витамина А, который включает (а) введение молекул нуклеиновой кислоты, кодирующей один из модифицированных ферментов ATF1, как определено здесь, в подходящие продуцирующие ретинол клетки-хозяева, в частности, в грибковые клетки-хозяева, как определено здесь, (b) энзиматическое превращение, т.е. ацетилирование ретинола типа, напр., смеси ретинолов, содержащей по меньшей мере 65-90% ретинола в виде транс-ретинола, под действием такой экспрессированной модифицированной ATF1, в ретирилацетат предпочтительно по меньшей мере на 50%, и (3) превращение данного ретирилацетата в витамин А при подходящих условиях, известных специалистам.

Термины “идентичность последовательности”, “% идентичности” применяются

здесь взаимозаменяемо. При этом для целей данного изобретения определяется, что для определения степени идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух последовательностей нуклеиновых кислот эти последовательности выравниваются с целью оптимального сравнения. Для оптимизации выравнивания между двумя последовательностями 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 оснований нуклеиновых кислот или аминокислот. Идентичность последовательностей означает процент идентичных совпадений между двумя последовательностями по указанной выровненной области. Степень идентичности между двумя аминокислотными последовательностями или между двумя нуклеотидными последовательностями можно определить с помощью алгоритма Needleman and Wunsch для выравнивания двух последовательностей (Needleman S.B. and Wunsch C.D. (1970) *J. Mol. Biol.* 48, 443-453). При помощи этого алгоритма можно выравнивать как аминокислотные последовательности, так и нуклеотидные последовательности. Алгоритм Needleman-Wunsch был встроен в компьютерную программу NEEDLE. Для целей данного 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. Используются оптимальные параметры – пеня за открытие пробела = 10 и пеня за расширение пробела = 0,5. Специалистам должно быть известно, что все эти различные параметры будут давать несколько разные результаты, но общая степень идентичности двух последовательностей существенно не изменяется при использовании различных алгоритмов.

После выравнивания при помощи программы NEEDLE, как описано выше, рассчитывается степень идентичности последовательностей между запрашиваемой последовательностью и последовательностью по изобретению следующим образом: количество соответствующих положений при выравнивании, где присутствуют идентичные аминокислоты или идентичные нуклеотиды в обеих последовательностях, делится на общую длину выравнивания за вычетом общего количества пробелов при выравнивании. Идентичность по данному определению можно получить по программе NEEDLE с помощью опции NOBRIEF и пометить в выходных данных как “идентичность по максимальной длине”. Если обе сравниваемые аминокислотные последовательности не

отличаются ни по одной из своих аминокислот, то они идентичны или проявляют идентичность на 100%.

Модифицированные ATF, в частности ферменты ATF1, как определено здесь, также охватывают ферменты, несущие другие аминокислотные замены, которые не изменяют активность фермента, то есть проявляют такие же свойства, как и ферменты, определенные здесь, и катализируют превращение ретинола в ретинилацетат с показателями конверсии предпочтительно не менее 50% от общего количества ретиноидов. Такие мутации также называются “молчащими мутациями”, которые не изменяют (энзиматическую) активность ферментов по настоящему изобретению.

Экспрессия ферментов/полинуклеотидов, кодирующих одну из конкретных ATF, в частности ферментов ATF1, как определено здесь, может осуществляться в любой системе клеток-хозяев, включая (микро)организмы, которые подходят для продукции ретиноидов (в том числе ретинола) и способствуют экспрессии нуклеиновых кислот, кодирующих один из описанных здесь ферментов, включая их функциональные эквиваленты или производные, описанные здесь. Примеры подходящих (микро)организмов, продуцирующих ретинол, включают бактерии, водоросли, грибы, включая дрожжи, клетки растений или животных. Предпочтительно бактерии относятся к родам *Escherichia* типа, напр., *Escherichia coli*, *Streptomyces*, *Pantoea* (*Erwinia*), *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Synechococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Mixococcus*, *Brevibacterium*, *Bradyrhizobium*, *Gordonia*, *Dietzia*, *Muricauda*, *Sphingomonas*, *Synochocystis*, *Paracoccus* типа, напр., *Paracoccus zeaxanthinifaciens*. Предпочтительно эукариотические микроорганизмы, в частности грибы, включая дрожжи, выбирают из *Saccharomyces* типа *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus* типа *Aspergillus niger*, *Pichia* типа *Pichia pastoris*, *Hansenula* типа *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces* типа *Kluyveromyces lactis*, *Phycomyces* типа *Phycomyces blakesleanus*, *Mucor*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Xanthophyllomyces*, *Phaffia*, *Blakeslea* типа, напр., *Blakeslea trispora* или *Yarrowia* типа *Yarrowia lipolytica*. В особенности предпочтительна экспрессия в грибковых клетках-хозяевах типа, напр., *Yarrowia* или *Saccharomyces*, либо экспрессия в *Escherichia*, более предпочтительно экспрессия в *Yarrowia lipolytica* или *Saccharomyces cerevisiae*.

В зависимости от клеток-хозяев, определенные здесь полинуклеотиды для ацетилирования ретинола можно оптимизировать для экспрессии в соответствующих клетках-хозяевах. Специалистам известно, как получить такие дополнительно модифицированные полинуклеотиды. Понятно, что определенные здесь полинуклеотиды охватывают и такие оптимизированные для хозяина молекулы нуклеиновых кислот, если только они все еще экспрессируют полипептид с соответствующей активностью, как

определено здесь.

Так, в одном воплощении настоящего изобретения предусмотрены продуцирующие ретинол клетки-хозяева, в особенности грибковые клетки-хозяева, содержащие полинуклеотиды, кодирующие ATF, в частности ферменты ATF1, как определено здесь, которые оптимизированы для экспрессии в данных клетках-хозяевах. В частности, продуцирующие ретинол клетки-хозяева, в частности грибковые клетки-хозяева, выбираются из дрожжей, напр., *Yarrowia* или *Saccharomyces*, таких, напр., как *Saccharomyces cerevisiae* или *Yarrowia lipolytica*, причем полинуклеотиды, кодирующие ATF, в частности ферменты ATF1, как определено здесь, выбирают из полинуклеотидов, экспрессирующих модифицированные полипептиды, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в последовательности, которая по меньшей мере на 20%, как-то, напр., 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:1, напр., при введении одной или нескольких аминокислотных замен в положениях, соответствующих 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, как определено здесь, предпочтительно содержащих сильно консервативную частичную аминокислотную последовательность, т.е. общий активный сайт или “мотив Prosite” из по меньшей мере 7 аминокислотных остатков, выбранных из [NDEHCS]-H-x(3)-D-[GA], соответствующих положениям от N218 до G224 в полипептиде по SEQ ID NO:1 (мотивы приведены в синтаксисе Prosite, как определено в https://prosite.expasy.org/scanprosite/scanprosite_doc.html), причем “x” означает произвольную аминокислоту. Предпочтительно, мотив Prosite выбран из [NDE]-H-x(3)-D-[GA], более предпочтительно из [ND]-H-x(3)-D-[GA], наиболее предпочтительно из N-H-x(3)-D-[GA], что соответствует положениям от N218 до G224 в полипептиде по SEQ ID NO:1; а клетки-хозяева вырабатывают ретинилацетат с содержанием предпочтительно в пределах от 50 до 90% от общего количества ретиноидов, вырабатываемых данными клетками-хозяевами, как-то, напр., при получении посредством экспрессии модифицированной LmATF1 при подходящих условиях культивирования, включая, без ограничения, культивирование на глюкозе, галактозе или ксилозе.

В отношении настоящего изобретения предполагается, что такие организмы, напр., как микроорганизмы, грибы, водоросли или растения также включают синонимы или базонимы данных видов, обладающие такими же физиологическими свойствами, как определено Международным кодексом номенклатуры прокариот или Международным кодексом номенклатуры водорослей, грибов и растений (Мельбурнским кодексом). Так,

например, *Lachancea mirantina* является синонимом штамма *Zygosaccharomyces* sp. IFO 11066, происходящего из Японии.

Настоящим изобретением предусмотрен способ получения ретинилацетата, в котором ретинилацетат образуется при ацетилировании ретинола (в частности, по меньшей мере 65% в виде транс-ретинола), как описано здесь, под действием модифицированной ATF, в частности ферментов ATF1, как описано здесь, причем ацетилирующие ферменты предпочтительно экспрессируются гетерологично в подходящих клетках-хозяевах в соответствующих условиях, как описано здесь. Образовавшийся ретинилацетат можно выделить и необязательно подвергнуть очистке из среды и/или клеток-хозяев. Такие ацетилированные ретиноиды, как определено здесь, можно использовать в качестве строительных блоков в многостадийном процессе, дающем витамин А. Витамин А можно выделить и необязательно подвергнуть очистке из среды и/или клеток-хозяев, как это известно в данной области.

Предпочтительно ацетилирование ретинола при помощи ATF, в частности ферментов ATF1, как описано здесь, дает степень конверсии в пределах от 50 до 90%, то есть содержание в пределах от 50 до 90% ацетилированных ретиноидов, т.е. ретинилацетата, присутствующего в смеси ретиноидов, вырабатываемых клетками-хозяевами, как-то, напр., при получении посредством экспрессии модифицированной LmATF1 при подходящих условиях культивирования, включая, без ограничения, культивирование на глюкозе, галактозе или ксилозе. В более предпочтительном воплощении в качестве субстрата для ацетилирования модифицированными ферментами, как определено здесь, используется смесь ретинола с содержанием по меньшей мере 65% транс-ретинола.

По сравнению с процессом с использованием немодифицированных ATF1, как определено здесь, содержание ацетилированных ретиноидов типа ретинилацетата может повышаться по меньшей мере в 0,2 раза, как-то в пределах от 0,2 до 4 раз и более при использовании продуцирующих ретинол клеток-хозяев, содержащих/экспрессирующих один из модифицированных ферментов ATF1, как определено здесь. Предпочтительно клетками-хозяевами могут быть грибковые клетки-хозяева, как-то, напр., выбранные из *Yarrowia* или *Saccharomyces*.

Клетки-хозяева, т.е. микроорганизмы, водоросли, грибковые, клетки животных или растений, способные вырабатывать ретинол, также могут быть способными вырабатывать β -каротин, который далее может ферментативно превращаться в ретиналь, который затем может превращаться в ретинол. Специалистам известно, какие гены следует использовать/экспрессировать для биосинтеза β -каротина и/или биопревращения β -каротина в ретинол.

Такие клетки-хозяева, которые способны экспрессировать модифицированные гены ATF, в частности гены ATF1, как определено здесь, и/или другие гены, необходимые для биосинтеза витамина А, можно культивировать в водной среде с добавлением соответствующих питательных веществ, в аэробных или анаэробных условиях, как это известно специалистам для соответствующих продуцирующих ретинол клеток-хозяев. Необязательно такое культивирование проводится в присутствии белков и/или кофакторов, участвующих в переносе электронов, которые известны в данной области. Подходящие источники углерода для целей настоящего изобретения можно выбрать из глюкозы, фруктозы, рафинозы, лактозы, галактозы, глицерина, ксилозы, арабинозы, сахарозы или мальтозы, предпочтительно из глюкозы, галактозы или ксилозы. Культивирование/выращивание клеток-хозяев может проводиться в периодическом режиме, с подпиткой, полунепрерывном или непрерывном режиме, предпочтительно в режиме с подпиткой в течение 80, 90, 100, 110, 120, 130 часов в подходящих условиях культивирования. В зависимости от клеток-хозяев предпочтительно продукция ретиноидов, напр., витамина А, его предшественников и/или производных типа ретиналя, ретинола, ретиниловых эфиров, в частности ретинилацетата, может варьироваться, как это известно специалистам. Культивирование и выделение вырабатывающих β -каротин и ретиноиды клеток-хозяев из числа *Yarrowia* и *Saccharomyces* описано, напр., в WO 2008/042338. Методы получения β -каротина и ретиноидов в клетках-хозяевах из числа *E. coli* описаны, напр., в US 2007/0166782.

В настоящем изобретении термин “удельная активность” или “активность” в отношении ферментов означает их каталитическую активность, то есть их способность катализировать образование продукта из данного субстрата. Удельная активность определяется количеством израсходованного субстрата и/или образовавшегося продукта за определенный период времени на определенное количество белка при определенной температуре. Как правило, удельная активность выражается в мкмоль израсходованного субстрата или образовавшегося продукта за 1 минуту на мг белка. Обычно мкмоль/мин сокращенно обозначается U (= единица). Поэтому определения единиц удельной активности в мкмоль/мин/(мг белка) или в U/(мг белка) применяются здесь взаимозаменяемо. Фермент активен, если он выполняет свою каталитическую активность *in vivo*, то есть внутри клетки-хозяина, как определено здесь, или в соответствующей (бесклеточной) системе в присутствии подходящего субстрата. Специалистам известно, как измеряется активность ферментов. В данной области известны аналитические методы оценки способности подходящих ATF, в частности ATF1, как определено здесь, к продукции ретинилацетата по превращению ретинола типа, напр., описанных в Примере 4

из WO 2014/096992. Вкратце, можно измерять титры таких продуктов, как ретинилацетат, ретинол, транс-ретиноаль, цис-ретиноаль, β -каротин и т.п. методом HPLC.

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

В настоящем изобретении “продуцирующие ретинол клетки-хозяева” означает такие клетки, в которых экспрессируются и активны *in vivo* соответствующие полипептиды, что приводит к продукции ретиноидов, напр., витамина А и его предшественников, включая ретинол, путем энзиматического превращения β -каротина через ретиноаль в ретинол. Эти полипептиды включают и модифицированные ATF, как определено здесь. В данной области известны гены пути витамина А и способы получения продуцирующих каротиноиды клеток-хозяев. Термин “ретиноид” включает ретинол, который применяется в качестве субстрата для модифицированных ацетилирующих ферментов, как определено здесь.

Ретиноиды в настоящем изобретении включают продукты расщепления β -каротина, также известные как апокаротиноиды, включая, без ограничения, ретиноаль, ретиноловую кислоту, ретинол, метоксиды ретиноидов, ретинилацетат, ретиниловые эфиры, 4-кеторетиноиды, 3-гидроксиретиноиды либо их комбинации. Длинноцепочечные ретиниловые эфиры в настоящем изобретении определяются как сложные углеводородные эфиры ретинола с жирными кислотами, причем жирные кислоты состоят по меньшей мере из 8, как-то, напр., от 9, 10, 12, 13, 15 или 20 до 26 атомов углерода типа, напр., 25, 22, 21 и менее атомов углерода, и предпочтительно содержат вплоть до 6 ненасыщенных связей, как-то, напр., 0, 1, 2, 4, 5, 6 ненасыщенных связей. Жирные кислоты в длинноцепочечных ретиниловых эфирах включают, без ограничения, линолевую кислоту, олеиновую кислоту или пальмитиновую кислоту. Биосинтез ретиноидов описан, напр., в WO 2008/042338.

“Ретиноаль” в настоящем изобретении известен под названием согласно IUPAC (2E,4E,6E,8E)-3,7-диметил-9-(2,6,6-триметилциклогексен-1-ил)нона-2,4,6,8-тетраенал. При этом он взаимозаменяемо именуется как ретиноальдегид или альдегид витамина А и охватывает как цис-, так и транс-изоформы, как-то, напр., 11-цис-ретиноаль, 13-цис-ретиноаль, транс-ретиноаль и полностью транс-ретиноаль.

Используемый здесь термин “каротиноиды” хорошо известен в данной области. Он

включает длинные сопряженные изопреноидные полиены с 40 атомами углерода, которые в природе образуются при лигировании двух содержащих по 20 атомов углерода молекул геранилгеранилпирофосфата. К ним относятся, без ограничения, фитоеен, ликопин и каротин, как-то, напр., β -каротин, который может окисляться в положении 4-кетогруппы или 3-гидроксигруппы с образованием кантаксантина, зеаксантина или астаксантина. Биосинтез каротиноидов описан, напр., в WO 2006/102342.

“Витамин А” в настоящем изобретении может означать любую химическую форму витамина А, встречающуюся в водных растворах, в твердых веществах и составах, и охватывает ретинол, ретинилацетат и ретиниловые эфиры. Он также включает ретиноевую кислоту, как-то, к примеру, недиссоциированную, в виде свободной кислоты или диссоциированную в виде аниона.

В частности, настоящим изобретением предусмотрены следующие воплощения.

(1) Фермент ацетилирования ретинола, предпочтительно грибковый фермент, в том числе дрожжевой фермент, содержащий одну или несколько аминокислотных замен в последовательности, которая по меньшей мере на 20%, как-то 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:1, причем одна или несколько аминокислотных замен располагаются 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 по SEQ ID NO:1, предпочтительно содержащих одну или несколько аминокислот, выбранных из группы, состоящей из остатка треонина в положении 68, остатка аспарагина, серина или аланина в положении 69, остатка аспарагина или лизина в положении 72, остатка лейцина в положении 73, остатка лизина или аспарагина в положении 171, остатка глицина в положении 172, остатка изолейцина в положении 174, остатка аланина или глицина в положении 176, остатка валина в положении 178, остатка серина или глицина в положении 291, остатка аланина, серина или аспарагина в положении 292, остатка лейцина или валина в положении 294, остатка фенилаланина в положении 301, остатка изолейцина в положении 307, остатка валина в положении 308, остатка метионина или изолейцина в положении 311, остатка аланина в положении 312, остатка аспарагина в положении 320, остатка валина или фенилаланина в положении 322, остатка лейцина в положении 334, остатка аланина в положении 362, остатка аланина в положении 405, остатка изолейцина в положении 407, остатка аланина в положении 409, остатка глутаминовой кислоты, лизина, метионина, фенилаланина или глутамина в положении 480, остатка валина в положении 483, остатка лейцина в

положении 484, остатка изолейцина в положении 490, остатка валина в положении 492, остатка аланина в положении 520, остатка аланина или валина в положении 521, остатка серина или треонина в положении 522, остатка аспарагина или серина в положении 524, остатка валина, изолейцина или аргинина в положении 525, остатка серина в положении 526 и их комбинаций в полипептиде по SEQ ID NO:1.

(2) Фермент ацетилирования ретинола по п. 1 и как определено здесь, содержащий сильно консервативную частичную аминокислотную последовательность из по меньшей мере 7 аминокислотных остатков, выбранных из [NDEHCS]-H-x(3)-D-[GA], соответствующих положениям от N218 до G224 в полипептиде по SEQ ID NO:1, причем этот мотив приведен в синтаксисе Prosite, а “х” означает произвольную аминокислоту.

(3) Фермент ацетилирования ретинола по п. 1 и/или 2 и как определено здесь, катализирующий превращение ретинола в ретинилацетат с показателем конверсии в пределах по меньшей мере от 50 до 90%.

(4) Фермент ацетилирования ретинола по п. 1 и/или 2 и/или 3 и как определено здесь, при этом активность по превращению или ацетилированию ретинола в ретинилацетат повышается по меньшей мере на 20% по сравнению с ферментом ацетилирования ретинола, не несущим одну или несколько из указанных аминокислотных замен.

(5) Фермент ацетилирования ретинола по п. 1 и/или 2 и/или 3 и/или 4 и как определено здесь, при этом активность по общей продукции ретиноидов повышается по меньшей мере в 2 раза по сравнению с ферментом ацетилирования ретинола, не несущим одну или несколько из указанных аминокислотных замен.

(6) Фермент ацетилирования ретинола по п. 1 и/или 2 и/или 3 и/или 4 и/или 5 и как определено здесь, содержащий единственную аминокислотную замену, расположенную в положении, соответствующем аминокислотному остатку, выбранному 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 и 526, предпочтительно выбранному из группы, состоящей из положений 69, 72, 334, 405, 407, 409, 480, 484, 525 и 526 в полипептиде по SEQ ID NO:1.

(7) Фермент ацетилирования ретинола по п. 1 и/или 2 и/или 3 и/или 4 и/или 5 и/или 6 и как определено здесь, содержащий по меньшей мере две аминокислотные замены в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам, выбранным из 480 и 409, 480 и 407 или 407 и 409 в полипептиде по SEQ ID NO: 1.

(8) Фермент ацетилирования ретинола по п. 7 и как определено здесь, дополнительно содержащий одну или несколько аминокислотных замен в положениях,

соответствующих аминокислотным остаткам, выбранным из группы, состоящей из положений 68, 69, 72, 311, 334, 484 и их комбинаций в полипептиде по SEQ ID NO:1.

(9) Фермент ацетилирования ретинола по п. 1 и/или 2 и/или 3 и/или 4 и/или 5 и/или 6 и/или 7 и/или 8 и как определено здесь, при этом остаток в положении 480 – лизин или глутамин, остаток в положении 409 – аланин, остаток в положении 407 – изолейцин, остаток в положении 69 – аланин, аспарагин или серин, а также необязательно содержащий лизин в положении 72 и/или изолейцин в положении 311 и/или треонин в положении 68 и/или лейцин в положении 334 и/или лейцин в положении 484.

(10) Фермент ацетилирования ретинола по п. 1 и/или 2 и/или 3 и/или 4 и/или 5 и/или 6 и/или 7 и/или 8 и/или 9 и как определено здесь, который экспрессируется в продуцирующих ретинол клетках-хозяевах, предпочтительно в грибковых клетках-хозяевах, более предпочтительно выбранных из *Yarrowia* или *Saccharomyces*.

(11) Продуцирующие ретинол клетки-хозяева, в частности грибковые клетки-хозяева, содержащие фермент по п. 1 и/или 2 и/или 3 и/или 4 и/или 5 и/или 6 и/или 7 и/или 8 и/или 9 и/или 10 и как определено здесь, причем данные клетки-хозяева предпочтительно выбраны из *Yarrowia* или *Saccharomyces*, которые предпочтительно были трансформированы ферментом ацетилирования ретинола по п. 1 и/или 2 и/или 3 и/или 4 и/или 5 и/или 6 и/или 7 и/или 8 и/или 9 и/или 10 и как определено здесь.

(12) Способ получения ретинилацетата, включающий получение продуцирующих ретинол клеток-хозяев по п. 11, культивирование данных клеток-хозяев в подходящей культуральной среде в соответствующих условиях культивирования и необязательно выделение и/или очистку ретинилацетата из среды.

(13) Способ повышения степени конверсии ретинола в ретинилацетат по меньшей мере на 20% в продуцирующих ретинол клетках-хозяевах, включающий трансформирование данных клеток-хозяев, предпочтительно грибковых клеток-хозяев, более предпочтительно клеток-хозяев, выбранных из *Yarrowia* или *Saccharomyces*, ферментом ацетилирования ретинола по п. 1 и/или 2 и/или 3 и/или 4 и/или 5 и/или 6 и/или 7 и/или 8 и/или 9 и/или 10 и как определено здесь.

(14) Способ повышения общей продукции ретиноидов по меньшей мере в 2 раза в продуцирующих ретинол клетках-хозяевах, включающий трансформирование данных клеток-хозяев, предпочтительно грибковых клеток-хозяев, более предпочтительно клеток-хозяев, выбранных из *Yarrowia* или *Saccharomyces*, ферментом ацетилирования ретинола по п. 1 и/или 2 и/или 3 и/или 4 и/или 5 и/или 6 и/или 7 и/или 8 и/или 9 и/или 10 и как определено здесь.

Краткое описание фигур

Фиг. 1. Конструирование продуцирующего ретинилацетат штамма *S. cerevisiae*, ult где показаны трансформированные последовательности ДНК и встраивание в геномную ДНК путем рекомбинации *in vivo* с помощью коннекторных последовательностей (“25”, “2A”, “2B” и “23”) и перекрывание с геномной ДНК. Для экспрессии DmBCO используются “P1” (= промотор TDH3 *S. cerevisiae*) и “T1” (= терминатор ENO1 *S. cerevisiae*); для экспрессии HsRDH12 используются “P2” (= промотор PGK1 *S. cerevisiae*) и “T2” (= терминатор GPM1 *S. cerevisiae*); а для экспрессии последовательностей LmATF1 дикого типа или мутантных (обозначаемых как LmATF1*) используются “P3” (= промотор ENO2 *S. cerevisiae*) и “T3” (= терминатор ADH1 *S. cerevisiae*). Более подробно см. Пример 5.

Следующие ниже примеры приводятся только для иллюстрации и не должны никоим образом ограничивать объем изобретения. Содержание всех ссылок, патентных заявок, патентов и публикаций патентных заявок, цитируемых в данной заявке, настоящим включено сюда путем ссылки, в частности, WO 2008/042338, WO 2014/096992, WO 2006/102342, US 2007/0166782, WO 2019/058000, WO 2016/110512, WO 2016/172282, US 2016/0130628, WO 2009/126890, WO 2014/195378, WO 2012/125027 или WO 2013/144257.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Общие методы, штаммы и плазмиды

Все описанные здесь основные процедуры молекулярной биологии и манипуляции с ДНК обычно выполняются согласно 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).

Анализ роста в планшетах (Yarrowia). Для проверки конверсионной активности мутантов обычно 800 мкл среды с 0,25% дрожжевого экстракта, 0,5% пептона (0.25x YP) инокулировали 10 мкл свежевыращенной Yarrowia и наслаивали сверху 800 мкл силиконового масла (Clearco, PFS-5cSt) с 5% глюкозы в качестве источника углерода в водной фазе. Трансформанты выращивали в 24-луночных планшетах (Microplate Devices 24 Deep Well Plates, Whatman 7701-5102), покрытых матовой крышкой (Analytical Sales and Services Inc., Plate Mats 24010CM), которые стерильно герметизировали лентой Qiagen Airpore Tape Sheets (19571) и встряхивали на многопланшетной качалке Infors (Multitron) при 30°C, 800 об/мин в течение 4 дней. Из лунок планшетов извлекали фракцию силиконового масла и проводили анализ на обратнофазовой колонке для UPLC с матричным фотодиодным детектором. Этот метод также применяется в Примере 2.

Рост в роллерных барабанах. Для проверки конверсионной активности ферментов ATF в *Saccharomyces* обычно 5 мл среды с 1% дрожжевого экстракта, 2% пептона (1x YP) инокулировали из свежей чашки с *Saccharomyces* и наслаивали сверху 500 мкл минерального масла (Drakeol 5, Penreco, Karns City, PA, USA) с 2% глюкозы или 2% галактозы (или же как указано иначе) в качестве источника углерода в водной фазе. Клональные изоляты трансформантов выращивали в стеклянных культуральных пробирках (VWR 47729-583), помещенных на роллерный барабан (New Brunswick Scientific TC-7), при 30°C в течение 4 дней. Из пробирок извлекали фракцию минерального масла и проводили анализ на обратнофазовой колонке для UPLC с матричным фотодиодным детектором. Этот метод также применяется в Примере 2.

Трансформация ДНК. Штаммы *Yarrowia lipolytica* трансформировали после роста в течение ночи на чашках со средой YPD. Из чашки соскребали 50 мкл клеток и трансформировали путем инкубации в 500 мкл с 1 мкг трансформирующей ДНК, обычно линейной ДНК для интегративной трансформации, 40% PEG 3550, 100 мМ ацетата лития, 50 мМ дитиотреитола, 5 мМ трис-Cl pH 8,0, 0,5 мМ EDTA в течение 30 мин при 40°C и высевали прямо в отборочную среду или, при отборе на доминирующем маркерном антибиотике, клетки подращивали на жидкой среде YPD в течение 4 часов при 30°C перед посевом на селективную среду. Штаммы *Saccharomyces* трансформировали литий-ацетатным методом из выращенных в YPD клеток в экспоненциальной фазе, которые получали путем субкультивирования ночной культуры в YPD. Собирали по 10^8 клеток за 1 трансформацию и ресуспендировали в смеси, содержащей 40% PEG 3350, 100 мМ ацетата лития, 10 мМ трис-Cl pH 8,0, 1 мМ EDTA, 5 мкг измельченной ДНК спермы лосося и 2 мкг линейаризованной трансформирующей ДНК в конечном объеме 500 мкл. Эту смесь инкубировали при 30°C в течение 1 часа, а затем при 42°C в течение 30 мин. Затем клетки осаждали, ресуспендировали в жидкой среде YPD и подращивали 3 часа при 30°C или в течение ночи при 22°C, чтобы обеспечить экспрессию гена устойчивости к антибиотикам HygR перед посевом на селективную среду, содержащую 100 мкг/мл гигромицина. Большинство используемых здесь последовательностей ДНК были оптимизированы по кодонам для экспрессии в соответствующей системе клеток-хозяев, как указано в списке последовательностей.

Молекулярная биология ДНК. Гены, предназначенные для *Yarrowia lipolytica*, синтезировали с концами NheI и MluI в векторе pUC57 (GenScript, Piscataway, NJ), с введением аминокислотных замен согласно табл. 4А-4Е (столбец «мутация») или табл. 5. Обычно ген LmATF1 (SEQ ID NO:3, оптимизированная по кодонам *Yarrowia lipolytica*), ген SbATF1 (SEQ ID NO:6, оптимизированная по кодонам *Yarrowia lipolytica*) и LffATF1

(SEQ ID NO:8, оптимизированная по кодонам *Yarrowia*) субклонировали в векторы MB5082 'URA3', MB6157 HygR и MB8327 NatR для отбора по маркерам при трансформации *Yarrowia lipolytica*, как в WO 2019/058000 (пример 1). Для получения мутантов Wa1ATF и Wa3ATF создавали плазмиды, содержащие соответствующий аллель ATF (SEQ ID NO: 12 и 14, оптимизированные по кодонам *Yarrowia lipolytica*), гены DrBCO (SEQ ID NO: 18, оптимизированная по кодонам *Yarrowia lipolytica*), ген FfRDH12 (SEQ ID NO: 22, оптимизированная по кодонам *Yarrowia lipolytica*) и URA3 в качестве отборочного маркера (см. табл. 5). Для чистой вставки генов путем случайного негомологичного соединения концов гена и маркера соответствующие расщепленные HindIII/XbaI (MB5082) или PvuII (MB6157 и MB8327) плазмиды очищали методом гель-электрофореза и на колонке для гель-фильтрации Qiagen. Маркер MB5082 'URA3' можно использовать повторно из-за фланкирующих повторяющихся последовательностей, позволяющих проводить отбор кольцевых «вырезок» кассеты URA3 на среде, содержащей FOA. Маркеры NatR и HygR можно удалить путем кратковременной экспрессии рекомбиназы Cre, образующей чувствительные к антибиотикам «вырезки» из-за фланкирующих сайтов lox. Опосредованная Cas9 делеция HOM3 проводилась путем предварительной трансформации эписомальной плазмиды MB7452 с Cas9 (SEQ ID NO: 25, оптимизированная по кодонам *Yarrowia lipolytica*) и отбора по маркеру NatR. После этого эписомальную плазмиду MB8549 (SEQ ID NO: 26, оптимизированная по кодонам *Yarrowia lipolytica*) с направляющей последовательностью для расщепления hom3 трансформировали по G418R. Проводили скрининг трансформантов на ауксотрофию по гомосерину, а затем секвенировали с помощью праймеров, фланкирующих последовательность HOM3, и отбирали чистые сдвиги рамки считывания для продвижения вперед. Для экспрессии мутантных ATF в *Saccharomyces cerevisiae* сначала конструировали штамм CAR-0002 следующим образом. Штамм CEN.PK113-7D (van Dijken et al., Enzyme Microb. Technol. 26(9-10), p. 706-714, 2000) трансформировали тремя кассетами, экспрессирующими гены каротиноидов crtE, crtYB и crtI из *Xanthophyllomyces dendrorhous*, оптимизированные по кодонам для экспрессии в *Saccharomyces cerevisiae*. Экспрессирующие кассеты встраивали в интеграционный сайт INT1 по методу CRISPR, как описано в примере 9 из WO 2016/110512. Экспрессирующими кассетами, содержащими сильные конститутивные промоторы (см. SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 142 и SEQ ID NO: 148 в WO 2016/110512) и фланкирующие последовательности донорной ДНК (см. SEQ ID NO:149 и SEQ ID NO:152 в WO 2016/110512), трансформировали CEN.PK113-7D. Последовательность геномной мишени INT1 (протоспейсера) приведена как SEQ ID NO:176 в WO 2016/110512. Интеграционный сайт INT1 находится в

некодирующей области между NTR1 (YOR071c) и GYP1 (YOR070c), расположенными на хромосоме XV. Штамм CEN.PK113-7D трансформировали методом LiAc/ДНК-носитель из спермы лосося (SS)/ПЭГ (Gietz and Woods, *Methods in Enzymology*, Vol. 350, p. 87-86, 2002), используя концентрации ДНК, описанные Verwaal et al. (*Yeast*, 35, p. 201-211, 2018). Затем создавали продуцирующий ретинол штамм MY4834 путем последовательной трансформации CAR-0002 линейаризованной SfiI плазмидой MB8433 (SEQ ID NO:27), содержащей кассету для конститутивной экспрессии DmBCO (SEQ ID NO: 20, оптимизированная по кодомам *Saccharomyces cerevisiae*; промотор TDH3, терминатор PGK1) с отбором на гигромицине, и ПЦР-ампликоном, полученным с помощью праймеров MO12301 (SEQ ID NO: 59) и MO12302 (SEQ ID NO:60) из плазмиды MB8431 (SEQ ID NO: 28), содержащей кассету для экспрессии HsRDH12 (SEQ ID NO: 24, оптимизированная по кодомам *Saccharomyces cerevisiae*; промотор TDH3, терминатор PGK1), направляя ПЦР-ампликон в локус URA3 при отборе на фтороротовой кислоте (FOA). Гены ATF (LmATF1 дикого типа, оптимизированная по кодомам *Saccharomyces cerevisiae* согласно SEQ ID NO: 4, и мутантов) для экспрессии в *Saccharomyces* синтезировали с концами XbaI и PstI по сайтам XbaI/SbfI в MB7621 (GenScript, Piscataway, NJ) для конститутивной экспрессии из промотора HSP26 или производного MB7621 с индуцибельной экспрессией из промотора GAL1, MB9606. MB9606 получали путем удаления промотора HSP26, содержащего фрагмент SpeI/XbaI, из MB7621 и замены его на последовательность промотора GAL1. В этих векторах используется ген NatR для отбора во время трансформации *Saccharomyces cerevisiae*. Для чистой вставки гена путем прицельной гомологической рекомбинации соответствующие расщепленные SfiI плазмиды очищали методом гель-электрофореза и на колонке Qiagen для гель-фильтрации. Маркер NatR удаляли из плазмиды MB7621 и её производных путем кратковременной экспрессии рекомбиназы Cre, образующей чувствительные к антибиотикам «вырезки» из-за фланкирующих сайтов lox. Плазмиды получали стандартными методами молекулярной генетики или методами биологического синтеза (GenScript, Piscataway, NJ).

Последовательности. Плазмиды и штаммы, содержащие соответствующие ферменты LmATF1 дикого типа (происходит из *L. mirantina*), SbATF1 (происходит из *S. bayanus*), LffATF1 (происходит из *L. fermentati*) или Wa1ATF и Wa3ATF (оба происходят из *Wickerhamomyces anomalus*), которые использовались (включая создание соответствующих аминокислотных замен, как описано здесь), приведены в табл. 1 и 2. Соответствующие нуклеотидные и аминокислотные последовательности представлены в перечне последовательностей, причем специально указаны оптимизированные по кодомам

последовательности для экспрессии в *Yarrowia lipolytica* или *Saccharomyces cerevisiae*.

Исходя из немодифицированной LmATF1 по SEQ ID NO:1, немодифицированной Wa1ATF по SEQ ID NO:11 и немодифицированной Wa3ATF по SEQ ID NO:13, вводили одну или несколько аминокислотных замен в выбранные положения, приведенные в табл. 4, 5, 6 и 8. Аминокислотные замены можно вводить в соответствующие положения аминокислотной последовательности SbATF1 (как-то, напр., N39S, N39A, F373A, K492S, G444L, G444F, G444M, G444Q, V371I, V491R, V491Q – либо в виде одиночной мутации, либо комбинации из по меньшей мере 2 мутаций на основе немодифицированной SbATF1 по SEQ ID NO: 5) или LffATF1 (как-то, напр., Q28S, Q28A, G363A, A482S, Q434L, Q434F, Q434M, V36I, V481R, V481Q – либо в виде одиночной мутации, либо комбинации из по меньшей мере 2 мутаций на основе немодифицированной LffATF1 по SEQ ID NO:7). Для экспрессии в *Saccharomyces cerevisiae* использовали плазмиды MB7621 и MB9442.

Таблица 1. Список плазмид, используемых для конструирования штаммов, несущих (немодифицированные или модифицированные) гетерологичные оптимизированные по кодам *Yarrowia lipolytica* гены ATF1 из *Lachancea mirantina* (LmATF1, SEQ ID NO:3), *Saccharomyces bayanus* (SbATF1, SEQ ID NO: 6), *Lachancea fermentati* (LffATF1, SEQ ID NO:8) и *Wickerhamomyces anomalus* (Wa1ATF, SEQ ID NO:12, и Wa3ATF, SEQ ID NO:14). Для экспрессии гена LmATF1 в *Saccharomyces* использовали оптимизированную по кодам последовательность SEQ ID NO:4. Кроме того, плазмиды MB9679 (SEQ ID NO: 29) и MB9688 (SEQ ID NO: 30) содержат гены, кодирующие DrBCO, FfRDH12 и URA3 в качестве отборочного маркера. Плазмиды, отмеченные знаком “*”, содержат оптимизированные по кодам рамки считывания для *S. cerevisiae*. Более подробно см. в тексте.

Плазмида	Каркас	Вставка
MB7452	MB6157	Cas9
MB8549	MB7200	Cas9 hom3
MB8457	MB5082	UmCCO1
MB8849	MB5082	LmATF1
MB8064	MB5082	SbATF1
MB8806	MB5082	LffATF1
MB9679	MB5082	Wa1ATF
MB9682	MB5082	Wa1ATF_G329A
MB9688	MB5082	Wa3ATF
MB9689	MB5082	Wa3ATF_T404M
MB9690	MB5082	Wa3ATF_T404Q
MB9606		экспрессирующий вектор/каркас для LmATF1
MB9608*	MB9606	LmATF дикого типа
MB9609*	MB9606	LmATF1_S480Q_V334L
MB9610*	MB9606	LmATF1_S480Q_G409A

MB9611*	MB9606	LmATF1_S480Q_G409A_V407I_H69A_I484L
MB9612*	MB9606	LmATF1_S480Q_G409A_V407I_H69A_V334L
MB8431*	MB7622	экспрессирующий вектор для HsRDH12
MB8433*	MB7622*	экспрессирующий вектор для DmBCO

Таблица 2. Список штаммов *Yarrowia* (обозначенных как “ML”), используемых для продукции ретиноидов и несущих гетерологичные (немодифицированные или модифицированные) гены ATF1. Более подробно см. в тексте.

Штамм	Описание	Впервые описан
ML7788	каротиновый штамм	WO 2016/172282
ML15710	ML7788, трансформированный MB7311-Mucor CarG	WO 2016/172282
ML17544	ML15710, избавленный от URA3 при помощи FOA и HygR под действием Cre/lox	здесь
ML17968	ML17544, трансформированный MB8457 UmCCO1	здесь
ML18183	ML17968, трансформированный MB7452 Cas9 NatR CEN	здесь
ML18210	ML18183, трансформированный MB8549 Cas9 hom3	здесь
ML18667	ML17544, трансформированный MB9679	здесь

Анализ ретинола методом обратнофазовой UPLC. При быстром скрининге этим методом не разделяются цис-изомеры, а только главные функциональные группы. Для ввода образцов использовали Waters Acquity UPLC с PDA-детектором (или аналогичным) и с автоматическим пробоотборником. Для разделения ретиноидов использовали Acquity UPLC HSS T3 1.8 μ m P/N 186003539. Подвижная фаза для родственных ретиноидам соединений состояла из 1000 мл гексана, 30 мл изопропанола и 0,1 мл уксусной кислоты. Скорость потока составляла 0,6 мл/мин. Температура колонки: 20°C. Вводимый объем: 5 мкл. Детектор представлял собой матричный фотодиодный детектор (PDA) в диапазоне от 210 до 600 нм. Определяли аналиты согласно табл. 3.

Таблица 3А. Список аналитов при анализе ретинола обратнофазовым методом. При сложении всех введенных промежуточных соединений получим общее количество ретиноидов. β -Каротин* может выявляться при 325 нм и будет мешать определению ретиниловых эфиров, поэтому нужно соблюдать осторожность при выявлении пика каротина и не включать его при определении ретиноидов. “Н/д” означает “нет данных”. Более подробно см. в тексте.

Соединение	Время удержания [мин]	Пик при λ [нм]	Фактор отклика
Ретинилацетат	2,93	325	1,00
Ретиниловые эфиры	3,2-3,8	325	1,68
Ретиналь	2,77	325	0,87
Ретинол	2,73	325	0,87
β -Каротин*	3,56	450	н/д

Таблица 3В. Градиент в методе UPLC, где растворитель А: вода; растворитель В: ацетонитрил; растворитель С: метанол; растворитель D: трет-бутилметилэфир.

Время [мин]	%A	%B	%C	%D	Поток [мл/мин]	Давление [psi/бар]
0	50	50	0	0	0,5	9500-14000 макс
0,50	50	50	0	0	0,5	
1,00	0	50	50	0	0,5	
1,25	0	0	100	0	0,5	
3,25	0	0	5	95	0,5	
3,50	0	0	5	95	0,5	
4,00	0	0	100	0	0,5	
4,25	0	50	50	0	0,5	
4,50	50	50	0	0	0,5	

Калибровка метода. Метод калибровали по ретинилацетату, а ретинол и ретиналь определяли относительно ретинилацетата, используя указанные коэффициенты отклика. Ретинилацетат растворяли в THF при ~200 мкг/мл для исходного раствора с помощью мерной колбы. Используя мерные колбы, делали разведения исходного раствора в 20, 50 и 100 раз в 50/50 метанол/МТВЕ. УФ-поглощение ретинилацетата довольно быстро становится нелинейным, поэтому нужно соблюдать осторожность, чтобы оставаться в пределах линейного диапазона. Следовательно, меньшие концентрации могут быть лучше. Для калибровки ретиниловых эфиров также можно использовать ретинилпальмитат. Пики для ретинилацетата отмечаются примерно через 3 минуты, а пики для ретиниловых эфиров (длинноцепочечных ретиниловых эфиров) примерно через 3,5 минуты.

Приготовление образцов. Образцы готовили различными способами в зависимости от условий. Для образцов цельного бульона или промытого бульона помещали бульон в пробирку Precellys[®], взвешивали и добавляли подвижную фазу. Вкратце, в пробирку на 2 мл Precellys[®] добавляли 25 мкл хорошо перемешанного бульона и 975 мкл THF. Затем образцы обрабатывали в гомогенизаторе Precellys[®] (Bertin Corp, Rockville, MD, США) при максимальной настройке 3X согласно указаниям производителя, обычно по 3×15×7500 об/мин. Для промытого осадка образцы центрифугировали в пробирках на 1,7 мл в микроцентрифуге при 10000 об/мин в течение 1 мин, декантировали бульон, добавляли 1 мл воды, перемешивали, осаждали и декантировали и доводили до исходного объема. Смесь опять осаждали, добавляли соответствующее количество подвижной фазы и обрабатывали путем взбивания с шариками Precellys[®]. Для анализа фракции силиконового масла образцы центрифугировали при 4000 об/мин в течение 10 мин, сливали масло сверху с помощью пипетки с положительным вытеснением (Eppendorf, Hauppauge, NY, США) и вносили в подвижную фазу, перемешивали на вибромешалке и измеряли концентрацию ретиноидов методом UPLC.

Условия ферментации с Yarrowia. Ферментация проводилась при описанных ранее условиях, предпочтительно с наслаиванием силиконового масла в резервуаре с мешалкой,

предпочтительно с глюкозой, в настольном реакторе общим объемом от 0,5 л до 5 л (см. WO 2016/172282). Обычно такие же результаты наблюдались и с реактором с подпиткой типа резервуара с мешалкой с повышенной производительностью, свидетельствующей о пригодности системы для получения ретиноидов. Предпочтительно ферментация проводилась при 5% глюкозы и с добавлением 20% силиконового масла после того, как растворенный кислород упадет до менее 20%, и подача возобновлялась для поддержания 20% растворенного кислорода на протяжении всей программы подпитки.

Пример 2. Получение ретинилацетата в *Yarrowia lipolytica*, экспрессирующих мутантную LmATF

Для экспрессии гетерологичной LmATF1 в *Yarrowia lipolytica* в качестве хозяина, продуцирующий ретинол штамм ML17968, содержащий ген, кодирующий β -каротиноксидазу UmCCO1 из *Ustilago maydis* (SEQ ID NO:16, оптимизирована по кодонам *Yarrowia lipolytica*), трансформировали очищенными PvuII-фрагментами гена, содержащими фрагменты гена ацетилтрансферазы, как определено здесь и представлено в оптимизированных по кодомам *Yarrowia lipolytica* последовательностях SEQ ID NO: 3, 6, 8, 10, соединенных с маркером устойчивости к гигромицину (HygR) для отбора на богатой среде (YPD), содержащей 100 мкг/мл гигромицина. Перед посевом культуры подращивали в YPD в течение 4 часов, чтобы синтезировались гены устойчивости к антибиотикам. Изоляты подвергали скринингу на ацетилирование по росту в планшетах, в частности, при 5-10% глюкозы в качестве источника углерода в 0,25X YP с наслоением силиконового масла, а успешные изоляты подвергали дальнейшему скринингу в реакторе с подпиткой типа резервуара с мешалкой с подачей глюкозы и наслоением силиконового масла, который показал повышение продуктивности на порядок, свидетельствующее о пригодности для получения ретиноидов. Результаты (по росту в планшетах) представлены в табл. 4, где приведено содержание ретинилацетата от общего количества ретиноидов, присутствующих в клетках-хозяевах, которое повышалось по меньшей мере в 0,3 раза по сравнению с клетками-хозяевами, экспрессирующими соответствующую немодифицированную ATF дикого типа. Сначала тестировали клоны только с одной аминокислотной заменой (см. табл. 4A).

Таблица 4A. Ацетилирование ретинола в ретинилацетат ("retAc"), которое усиливается под действием модифицированных ферментов ATF1, содержащих одну аминокислотную замену в положении, соответствующем аналогичному положению в ATF1 из *Lachancea mirantina* по SEQ ID NO: 1, обозначенной как "wt", т.е. немодифицированная, по сравнению с немодифицированной ATF1 из *Saccharomyces bayanus* (SbATF1-wt) по SEQ ID NO:5 и *Lachancea fermentati* (LffATF1-wt) по SEQ ID

NO:7. Более подробно см. текст.

Мутация	% retAc
SbATF1-wt	10.3
LffATF1-wt	11.7
LmATF1-wt	40.4
LmATF1-Q68T	55.2
LmATF1-H69A	61.7
LmATF1-H69N	59.4
LmATF1-H69S	60.9
LmATF1-Q72K	61.9
LmATF1-Q72N	55.4
LmATF1-G171K	55.0
LmATF1-G171N	58.6
LmATF1-N172G	53.3
LmATF1-Q173L	57.3
LmATF1-V174I	57.0
LmATF1-S176A	55.0
LmATF1-S176G	57.1
LmATF1-L178V	53.0
LmATF1-A291G	52.4
LmATF1-A291S	50.7
LmATF1-G292A	53.4
LmATF1-G292N	57.4
LmATF1-G292S	55.6
LmATF1-F294L	54.1
LmATF1-F294V	58.4
LmATF1-Y301F	55.5
LmATF1-P307I	54.5
LmATF1-T308V	55.6
LmATF1-T311I	56.6
LmATF1-T311M	55.2
LmATF1-S312A	53.7
LmATF1-H320N	57.4
LmATF1-Y322F	57.3
LmATF1-Y322V	56.3
LmATF1-V334L	62.7
LmATF1-V334M	53.1
LmATF1-S362A	54.4
LmATF1-S405A	60.8
LmATF1-V407I	66.8
LmATF1-G409A	62.9
LmATF1-S480E	52.4
LmATF1-S480F	61.4
LmATF1-S480L	60.3
LmATF1-S480M	62.8
LmATF1-S480Q	65.6
LmATF1-L483V	54.6
LmATF1-I484L	60.9
LmATF1-V490I	55.7
LmATF1-D492V	53.9

LmATF1-I520A	54.2
LmATF1-C521A	54.3
LmATF1-C521V	57.6
LmATF1-A522S	55.3
LmATF1-A522T	58.6
LmATF1-D524N	52.3
LmATF1-D524S	57.7
LmATF1-Q525V	56.6
LmATF1-Q525I	57.6
LmATF1-Q525R	67.0
LmATF1-G526S	64.8

Далее проводили тестирование с комбинациями из двух аминокислотных замен, а результаты представлены в табл. 4В.

Таблица 4В. Ацетилирование ретинола в ретинилацетат (“retAc”), которое усиливается под действием модифицированных ферментов ATF1, содержащих две аминокислотные замены в положениях, соответствующих аналогичным положениям в ATF1 из *Lachanea mirantina* по SEQ ID NO: 1, обозначенной как “wt”, по сравнению с немодифицированной ATF1 из *Saccharomyces bayanus* (SbATF1-wt) по SEQ ID NO:5 и *Lachanea fermentati* (LffATF1-wt) по SEQ ID NO:7. Более подробно см. в тексте.

	% retAc
SbATF1-wt	10.3
LffATF1-wt	11.7
LmATF1-wt	40.4
LmATF1-V407I H69S	67.0
LmATF1-V407I Q72K	66.0
LmATF1-V407I T311I	56.2
LmATF1-V407I V334L	65.7
LmATF1-V407I S480L	61.3
LmATF1-V407I I484L	65.3
LmATF1-G409A H69N	67.0
LmATF1-G409A H69S	69.6
LmATF1-G409A H69A	74.2
LmATF1-G409A Q72K	59.7
LmATF1-G409A T311I	65.9
LmATF1-G409A V334L	63.4
LmATF1-G409A V407I	67.4
LmATF1-G409A S480L	52.0
LmATF1-S480Q Q68T	65.8
LmATF1-S480Q H69N	63.8
LmATF1-S480Q H69S	69.6
LmATF1-S480Q H69A	70.1
LmATF1-S480Q Q72K	62.8
LmATF1-S480Q T311I	62.7
LmATF1-S480Q V334L	75.3
LmATF1-S480Q V407I	73.8
LmATF1-S480Q G409A	73.5
LmATF1-S480Q I484L	67.0

Некоторые из двойных мутантов, протестированных выше, подвергали дальнейшей модификации путем введения дополнительной мутации, т.е. получали тройные мутации. Результаты представлены в табл. 4С.

Таблица 4С. Ацетилирование ретинола в ретинилацетат (“retAc”), которое усиливается под действием модифицированных ферментов ATF1, содержащих три аминокислотные замены в положениях, соответствующих аналогичным положениям в ATF1 из *Lachanea mirantina* по SEQ ID NO: 1, обозначенной как “wt”, по сравнению с немодифицированной ATF1 из *Saccharomyces bayanus* (SbATF1-wt) по SEQ ID NO:5 и *Lachanea fermentati* (LffATF1-wt) по SEQ ID NO:7. Более подробно см. в тексте.

Мутация	% retAc
SbATF1-wt	10.3
LffATF1-wt	11.7
LmATF1-wt	40.4
LmATF1-G409A V407I H69N	70.3
LmATF1-G409A V407I Q72K	68.7
LmATF1-G409A V407I T311I	70.6
LmATF1-G409A V407I V334L	71.1
LmATF1-G409A V407I S480L	59.2
LmATF1-G409A V407I I484L	69.9
LmATF1-S480Q V407I Q68T	58.5
LmATF1-S480Q V407I H69N	64.1
LmATF1-S480Q V407I H69S	67.1
LmATF1-S480Q V407I H69A	69.9
LmATF1-S480Q V407I Q72K	67.0
LmATF1-S480Q V407I T311I	70.2
LmATF1-S480Q V407I V334L	63.1
LmATF1-S480Q V407I I484L	58.1
LmATF1-S480Q G409A Q68T	63.7
LmATF1-S480Q G409A H69A	67.2
LmATF1-S480Q G409A H69N	67.3
LmATF1-S480Q G409A I484L	67.6

На следующей стадии тестировали комбинации тройных мутаций LmATF1-S480Q G409A V407I с дополнительными одинарными мутациями. Результаты представлены в табл. 4D.

Таблица 4D. Ацетилирование ретинола в ретинилацетат (“retAc”), которое усиливается под действием модифицированных ферментов ATF1, содержащих 4 аминокислотные замены в положениях, соответствующих аналогичным положениям в ATF1 из *Lachanea mirantina* по SEQ ID NO: 1, обозначенной как “wt”, по сравнению с немодифицированной ATF1 из *Saccharomyces bayanus* (SbATF1-wt) по SEQ ID NO:5 и *Lachanea fermentati* (LffATF1-wt) по SEQ ID NO:7. Более подробно см. в тексте.

Мутация	% retAc
SbATF1-wt	10.3
LffATF1-wt	11.7
LmATF1-wt	40.4
LmATF1-S480Q G409A V407I H69N	75.2
LmATF1-S480Q G409A V407I H69A	76.7
LmATF1-S480Q G409A V407I H69S	77.4
LmATF1-S480Q G409A V407I Q72K	63.2
LmATF1-S480Q G409A V407I T311I	76.8
LmATF1-S480Q G409A V407I V334L	77.6
LmATF1-S480Q G409A V407I I484L	74.1
LmATF1-S480L G409A V407I T311I	73.1

Наконец, тестировали комбинации из 5 аминокислотных замен, включающие модификации аминокислотных остатков S480, G409, V407 и H69, на ацетилирование ретинола. Результаты представлены в табл. 4Е.

Таблица 4Е. Ацетилирование ретинола в ретинилацетат (“retAc”), которое усиливается под действием модифицированных ферментов ATF1, содержащих 5 аминокислотных замен в положениях, соответствующих аналогичным положениям в ATF1 из *Lachanea mirantina* по SEQ ID NO: 1, обозначенной как “wt”, по сравнению с немодифицированной ATF1 из *Saccharomyces bayanus* (SbATF1-wt) по SEQ ID NO:5 и *Lachanea fermentati* (LffATF1-wt) по SEQ ID NO:7. Более подробно см. в тексте.

Мутация	% retAc
SbATF1-wt	10,3
LffATF1-wt	11,7
LmATF1-wt	40,4
LmATF1-S480Q G409A V407I H69A V334L	77,6
LmATF1-S480Q G409A V407I H69A I484L	83,8
LmATF1-S480Q G409A V407I H69S Q72K	55,9
LmATF1-S480Q G409A V407I H69N Q72K	59,8
LmATF1-S480Q G409A V407I H69N T311I	56,1
LmATF1-S480Q G409A V407I H69N V334L	63,3
LmATF1-S480Q G409A V407I H69N I484L	68,9

Как видим, при использовании LmATF1, несущей одну или несколько мутаций в *Yarrowia*, содержание ретинилацетата повышается вплоть до двух раз по сравнению с использованием LmATF1 дикого типа.

Пример 3. Получение ретинилацетата в *Yarrowia lipolytica*, экспрессирующих мутантную WaATF

Для экспрессии гетерологичной ATF в *Yarrowia lipolytica* в качестве хозяина предприняли такой же подход, как в Примере 2, за исключением того, что трансформировали модифицированное производное ML17544, ML18667, плазмидой, приведенной в табл. 5, каждая из которых состоит из указанного аллеля ATF (т.е. дикого

типа или модифицированного из Wa1ATF по SEQ ID NO:12 или Wa3ATF *Yarrowia lipolytica* по SEQ ID NO: 14), DrBCO (SEQ ID NO:18, оптимизирована по кодонам *Yarrowia lipolytica*) и FfRDH12 (SEQ ID NO:22, оптимизирована по кодонам *Yarrowia lipolytica*). Проводили отбор трансформантов ML18667 с линейаризованными SfiI плазмидами из табл. 5А на прототрофность по урацилу. Трансформанты выращивали в планшетах, как в Примере 2, а содержание ретинилацетата при использовании мутантных ATF относительно содержания ретинилацетата при использовании ATF дикого типа (принятого за 100%) представлено в табл. 5.

Как видим, при использовании гомологов ATF из *Wickerhamomyces anomalus*, несущих одну или несколько мутаций в *Yarrowia*, содержание ретинилацетата повышается вплоть до двух раз по сравнению с использованием LmATF1 дикого типа.

Таблица 5. Ацетилирование ретинола в ретинилацетат (“retAc”), которое усиливается под действием модифицированных ферментов ATF1, содержащих одну аминокислотную замену в положении, соответствующем аналогичному положению в Wa1ATF и Wa3ATF из *Wickerhamomyces anomalus* по SEQ ID NO:11 и 13, соответственно, обозначенных как “wt”, т.е. немодифицированные. Образование ретинилацетата при использовании ATF дикого типа (wt) принято за 100%. Более подробно см. в тексте.

Плазмида	Мутация	retAc
MB9679	Wa1ATF-wt	100%
MB9682	Wa1ATF-G329A	416%
MB9688	Wa3ATF-wt	100%
MB9689	Wa3ATF-T404M	136%
MB9690	Wa3ATF-T404Q	132%

Пример 4. Получение ретинилацетата в *Saccharomyces cerevisiae*, экспрессирующих мутантную ATF

Для экспрессии гетерологичной LmATF1 (дикого типа и мутантной на основе SEQ ID NO:4, оптимизированной по кодонам *Saccharomyces cerevisiae*) в *Saccharomyces cerevisiae* в качестве хозяина, продуцирующий ретинол штамм MY4834 (см. пример 1) трансформировали расщепленными SfiI очищенными фрагментами гена, содержащими маркер устойчивости к нурсеотрицину (NatR) для отбора на богатой среде (YPD), содержащей 100 мкг/мл нурсеотрицина. Перед посевом культуры подрачивали в YPD в течение 3 часов, чтобы синтезировались гены устойчивости к антибиотику. Проводили трансформацию с 2,5-3 мкг линейаризованной плазмиды параллельно с плазмидой, экспрессирующей остов, лишенный LmATF1 (MB9606), но с маркером NatR. Трансформационные смеси высевали на глюкозу и проводили скрининг на продукцию ретинилацетата в культуральных пробирках при выращивании, как описано выше (Пример 1). После выращивания культуры центрифугировали, брали пробы из

наслоенного минерального масла и подвергали их анализу методом UPLC (см. Пример 1). Результаты представлены в табл. 6, где приведено содержание ретинилацетата при использовании мутантных ATF относительно содержания ретинилацетата при использовании ATF дикого типа (принятого за 100%). Как видим, при использовании LmATF1, несущей две или несколько мутаций в *Saccharomyces*, содержание ретинилацетата повышается вплоть до двух раз по сравнению с использованием LmATF1 дикого типа.

Таблица 6. Ацетилирование ретинола, которое усиливается под действием различных мутантов LmATF1 по сравнению с LmATF1 дикого типа по SEQ ID NO: 1, обозначенной как “wt”, т.е. немодифицированная. “retAc” означает ретинилацетат, а образование ретинилацетата при использовании ATF дикого типа (wt) принято за 100%. Более подробно см. в тексте.

Плазмида	Мутация	retAc
MB9606	пустой вектор	0
MB9608	LmATF1-wt	100%
MB9609	LmATF1_S480Q_V334L	237%
MB9610	LmATF1_S480Q_G409A	187%
MB9611	LmATF1-S480Q_G409A_V407I_H69A_I484L	115%
MB9612	LmATF1_S480Q_G409A_V407I_H69A_V334L	117%

Близкие результаты были получены при выращивании клеток-хозяев, содержащих мутантные LmATF1, экспрессируемые из конститутивного промотора на глюкозе, т.е. четкое повышение образования ретинилацетата при введении мутаций по сравнению с клетками дикого типа, как видно из табл. 6.

Пример 5. Получение ретинилацетата в *Saccharomyces cerevisiae*, экспрессирующих мутантную ATF с ксилозой в качестве источника углерода

В этом примере представлено получение ретинилацетата в *S. cerevisiae* при использовании ксилозы в качестве источника углерода. Продукцию ретинилацетата при использовании ксилозы сравнивали с продукцией при использовании глюкозы в качестве источника углерода.

Трансформация кассетами для экспрессии генов каротиноидов. Штамм RN1014 (WO 2014/195378A1) получали путем инженерии штамма RN1001 (WO 2012/125027) *in vivo* на ксилозе и уксусной кислоте. Генотип штамма RN1001: MATa, *ura3-52*, *leu2-112*, *gre3::loxP*, *loxP-Ptpi::TAL1*, *loxP-Ptpi::RKI1*, *loxP-Ptpi-TKL1*, *loxP-Ptpi-RPE1*, *delta::Padhl* *XKS1Tcyc1-LEU2*, *delta::URA3-Ptpi-xyIA-Tcyc1*.

Штамм RN1014 трансформировали тремя кассетами для экспрессии генов каротиноидов *crtE*, *crtYB* и *crtI* из *Xanthophyllomyces dendrorhous*, оптимизированных по кодонам для экспрессии в *Saccharomyces cerevisiae*. Экспрессирующие кассеты встраивали

в интеграционный сайт INT1 по методу CRISPR, как описано в примере 9 из WO 2016/110512. Экспрессирующими кассетами, содержащими сильные конститутивные промоторы (см. SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:142 и SEQ ID NO:148 в WO 2016/110512) и фланкирующие последовательности донорной ДНК (см. SEQ ID NO:149 и SEQ ID NO:152 в WO 2016/110512), трансформировали RN1014. Последовательность геномной мишени INT1 (протоспейсера) приведена как SEQ ID NO:176 в WO 2016/110512. Интеграционный сайт INT1 находится в некодирующей области между NTR1 (YOR071c) и GYP1 (YOR070c), расположенными на хромосоме XV. Штамм RN1014 трансформировали методом LiAc/ДНК-носитель из спермы лосося (SS)/ПЭГ (Gietz and Woods, *Methods in Enzymology*, Vol. 350, p. 87-86, 2002), используя концентрации ДНК, описанные Verwaal et al. (*Yeast*, 35, p. 201-211, 2018).

Трансформационные смеси высевали на YPD-агар (10 г/л дрожжевого экстракта, 20 г/л пептона, 20 г/л декстрозы, 20 г/л агара), содержащий 200 мкг/мл нурсеотрицина (NatMX, Jena Bioscience, Германия) и 200 мкг/мл G418 (Sigma Aldrich, Zwijndrecht, Нидерланды). Чашки с агаром инкубировали при 30°C до появления колоний на чашках.

При введении и гиперэкспрессии трех генов: *crtE*, *crtYB* и *crtI* из *Xanthophyllomyces dendrorhous* в *Saccharomyces cerevisiae* трансформанты будут вырабатывать каротиноиды с β -каротином в качестве конечного продукта, который является окрашенным соединением и поэтому он дает окрашенные трансформанты (Verwaal et al., *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 73, No. 13, p. 4342-4350, 2007). Первым признаком успешной трансформации клеток RN1014 является появление окрашенных трансформантов. Правильность встраивания кассет, экспрессирующих ДНК донора *crt*, можно проверить методом ПЦР, используя, к примеру, геномную ДНК, выделенную из трансформанта, известными специалистам методами. Производство каротиноидов в трансформантах RN1014 можно определить, как описано в примере 9 из WO 2016/110512.

После этого из трансформантов PRN1014, содержащих кассеты для экспрессии *crtE*, *crtYB* и *crtI*, удаляли плазмиду для экспрессии направляющей РНК, но сохраняли плазмиду pCSN061 (SEQ ID NO:31), экспрессирующую Cas9. Колонии инокулировали в среду YPD с добавлением 200 мкг/мл G418 и инкубировали жидкие культуры во встряхиваемых колбах не менее двух дней при 30°C и 250 об/мин в инкубаторе с качалкой. Аликвоты наносили штрихом на чашки с YPD-агаром с добавлением 200 мкг/мл G418 и инкубировали чашки не менее двух дней при 30°C. Отдельные колонии пересеивали штрихом на чашки с YPD-агаром с добавлением 200 мкг/мл G418 и чашки с YPD-агаром с добавлением 200 мкг/мл G418 и 200 мкг/мл нурсеотрицина (NatMX, Jena

Bioscience, Германия). Чашки инкубировали не менее двух дней при 30°C. Отбирали отдельные колонии, растущие на чашках, содержащих G418, но не на чашках, содержащих G418 и нурсеотрицин, что указывает на потерю плазмиды с направляющей РНК. Такие трансформанты PRN1014, содержащие кассеты для экспрессии *crtE*, *crtYB* и *crtI* и плазмиду pCSN061, экспрессирующую Cas9, именуются штаммами PRN1014_*crtE_crtYB_crtI*+pCSN061.

Сборка и амплификация кассет для экспрессии донорной ДНК DmBCO, HsRDH12 и LmATF1 (дикого типа и мутантной). Для превращения β -каротина в ретинилацетат через промежуточные продукты ретиналь и ретинол штамм PRN1014_*crtE_crtYB_crtI*+pCSN061 трансформировали тремя экспрессионными кассетами, содержащими гены β -каротиноксидазы *Drosophila melanogaster* (DmBCO по SEQ ID NO:20, оптимизированной по кодонам *Saccharomyces cerevisiae*), ретинолдегидрогеназы *Homo sapiens* (HsRDH12 по SEQ ID NO: 24, оптимизированной по кодонам *Saccharomyces cerevisiae*) и ацетилтрансферазы *Lachancea mirantina* (LmATF1, дикого типа по SEQ ID NO:4 или мутантной).

Двухцепочечные кассеты с донорной ДНК, кодирующей гены DmBCO, HsRDH12 и LmATF1 (дикого типа или мутантной), получали по реакции Golden-Gate для сборки индивидуальных последовательностей промотора (P), ORF (O) и терминатора (T) в соответствующих клетках *E. coli*, содержащих остов вектора, как описано в примере 1 из WO 2013/144257A1. Последовательности промотора и терминатора происходят из штамма S288C *Saccharomyces cerevisiae* (Mortimer and Johnston, Genetics 113, p. 35-43, 1986). Для экспрессии DmBCO использовали последовательности промотора TDH3 и терминатора ENO1, входящие в SEQ ID NO:33. Для экспрессии HsRDH12 использовали последовательности промотора PGK1 и терминатора GPM1, входящие SEQ ID NO:34. Для экспрессии LmATF1 дикого типа или мутантных использовали последовательности промотора ENO2 и терминатора ADH1, входящие в SEQ ID NO:35 – SEQ ID NO:42. Последовательности ДНК промотора, ORF и терминатора синтезировали у поставщика синтетической ДНК, напр., ATUM (Newark, CA, США) с доставкой в отдельных стандартных клонирующих векторах. Принимающий остов вектора (описанный в WO 2013/144257 A1, пример 1) содержит последовательности коннекторов 25 и 2A (в составе SEQ ID NO: 33), последовательности коннекторов 2A и 2B (в составе SEQ ID NO: 34) или последовательности коннекторов 2B и 23 (напр., в составе SEQ ID NO: 35). Готовые последовательности содержат коннекторные последовательности из 50 пар оснований (п.н.) на своих 5'- и 3'-концах, которые позволяют рекомбинацию фрагментов ДНК *in vivo* в *S. cerevisiae*, как описано в примере 1 из WO 2013/144257A1. Сводка полученных

последовательностей представлена в табл. 7.

Собранные кассеты POT подвергали амплификации по реакции ПЦР с праймерами, указанными в табл. 7, используя плазмиды, полученные по реакции Golden-Gate, в качестве матриц для получения донорных фрагментов ДНК для трансформации с получением штамма PRN1014_crtE_crtYB_crtI+pCSN061. В реакциях ПЦР, которые проводились согласно инструкциям производителя, использовали ДНК-полимеразу Q5 (в составе смеси Q5[®] High-Fidelity 2X Master Mix, New England Biolabs, поставляемой фирмой Bioké, Leiden, Нидерланды, кат. № M0492S). Размеры ПЦР-фрагментов проверяли стандартным методом электрофореза в агарозе. ПЦР-фрагменты очищали с помощью наборов NucleoSpin Gel и PCR Clean-up kit (Machery-Nagel, поставляются фирмой Bioké, Leiden, Нидерланды) согласно инструкциям производителя. Концентрацию ДНК измеряли по методу NanoDrop (спектрофотометр ND-1000, Thermo Fisher Scientific).

Амплификация последовательностей, фланкирующих донорную ДНК. Выделяли геномную ДНК (гДНК) из штамма дрожжей потомства CEN.PK (к примеру, CEN.PK2-1C, MATa; his3D1; leu2-3_112; ura3-52; trp1-289; MAL2-8c; SUC2) или из штамма PRN1014 методом с ацетатом лития и SDS (Ldöke et al., BioTechniques 50, p. 325-328, 2011). Штамм CEN.PK2-1C доступен из коллекции EUROSCARF (<http://www.euroscarf.de>, Frankfurt, Германия).

Выделенную геномную ДНК использовали в качестве матрицы в реакциях ПЦР, как описано выше, получая ПЦР-фрагменты, используемые в качестве донора фланкирующих последовательностей ДНК (SEQ ID NO:53 и SEQ ID NO:54, имеющие перекрытие с геномной ДНК для встраивания в геном и содержащие коннекторные последовательности), с помощью специфических комбинаций прямых и обратных праймеров, приведенных в табл. 7. Фланкирующие донорную ДНК последовательности содержат коннекторные последовательности в 50 п.н. в 5'- или 3'-положении. Наличие коннекторных последовательностей делает возможной рекомбинацию *in vivo* между коннекторными последовательностями, которые также входят в состав кассет для экспрессии донорной ДНК, как описано в примере 1 из WO 2013/144257 A1.

Таблица 7. Последовательности донорной ДНК для введения при трансформации штамма PRN1014_crtE_crtYB_crtI+pCSN061. Прямые (FW) и обратные (REV) праймеры, используемые для амплификации, обозначены по соответствующим SEQ ID NOs (из списка последовательностей). Con – уникальные коннекторные последовательности в 50 п.н., присутствующие на 5'- и 3'-концах последовательности экспрессионных кассет. Более подробно см. в тексте.

SEQ ID NO:	Описание донорной ДНК	Прямой праймер	Обратный праймер
33	экспрессионная кассета con25-DmBCO-con2A	43	44
34	экспрессионная кассета con2A-HsRDH12-con2B	45	46
35	экспрессионная кассета con2B-LmATF1-con23	47	48
36	экспрессионная кассета con2B-LmATF1_S480Q_V334L-con23	47	48
37	экспрессионная кассета con2B-LmATF1_S480Q_V407I-con23	47	48
38	экспрессионная кассета con2B-LmATF1_S480Q_G409A-con23	47	48
39	экспрессионная кассета con2B-LmATF1_S480Q_V407I_H69A-con23	47	48
40	экспрессионная кассета con2B-LmATF1_S480Q_G409A_V407I-con23	47	48
41	экспрессионная кассета con2B-LmATF1_S480Q_G409A_V407I_I484L-con23	47	48
42	экспрессионная кассета con2B-LmATF1_S480Q_G409A_V407I_H69A_I484L-con23	47	48
53	фланкирующая последовательность 5'-INT70-con25	49	50
54	фланкирующая последовательность con23-INT70-3'	51	52

Кассета для экспрессии направляющей РНК. Кассету для экспрессии направляющей РНК заказывали в виде кассеты из синтетической ДНК (фрагмент гена gBlocks на фирме Integrated DNA Technologies, Leuven, Бельгия). Кассета для экспрессии направляющей РНК (SEQ ID NO: 55) состоит из различных элементов, как описано в примере 9 из WO 2016/110512, включая последовательность геномной мишени INT70 (протоспейсера) (SEQ ID NO:6). Кассета для экспрессии направляющей РНК INT70 содержит перекрывающиеся последовательности с вектором pRN1120 (SEQ ID NO:32), образуя при трансформации и рекомбинации *in vivo* в дрожжах кольцевой вектор, позволяющий проводить отбор на нурсеотрицине, как изложено в примере 9 из WO 2016/110512.

GBlock лигировали с вектором pCR-BluntII-TOPO (набор Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit, Life Technologies, Grand Island, NY, США) согласно инструкциям производителя. Используя вектор TOPO, содержащий gBlock в качестве матрицы, ДНК-полимеразу Q5 (BioLabs, Leiden, Нидерланды) и праймеры, приведенные в SEQ ID NO:57 и SEQ ID NO: 58, получали ПЦР-фрагмент кассеты для экспрессии направляющей РНК при реакции ПЦР согласно инструкциям производителя. ПЦР-фрагмент кассеты для экспрессии направляющей РНК очищали с помощью наборов NucleoSpin Gel и PCR Clean-up kit (Machery-Nagel, поставляются фирмой BioLabs, Leiden, Нидерланды) согласно инструкциям производителя. Концентрацию ДНК измеряли по методу NanoDrop (спектрофотометр ND-1000, Thermo Fisher Scientific).

Эксперименты по трансформации дрожжей. Трансформацию штамма

PRN1014_crtE_crtYB_crtI+pCSN061 проводили методом LiAc/ДНК-носитель из спермы лосося (SS)/ ПЭГ (Gietz and Woods, см. выше).

Перед трансформацией проводили линейризацию плазмиды pRN1120 (SEQ ID NO: 32) с помощью рестрикционных ферментов EcoRI и XhoI. Затем линейризованный вектор очищали с помощью наборов NucleoSpin Gel и PCR Clean-up kit (Machery-Nagel, поставляются фирмой Bioké, Leiden, Нидерланды) согласно инструкциям производителя. Концентрацию ДНК измеряли по методу NanoDrop (спектрофотометр ND-1000, Thermo Fisher Scientific).

Сводка по различным экспериментам по трансформации представлена в табл. 8. В каждом эксперименте по трансформации в смесь для трансформации вносили следующие количества донорной ДНК: 100-1000 нг линейризованной плазмиды pRN1120, по 100-1000 нг каждой кассеты для экспрессии донорной ДНК, по 100-1000 нг каждой фланкирующей РНК INT70 (SEQ ID NO: 55). Например, вносили 100 нг линейризованной плазмиды pRN1120, по 200 нг каждой кассеты для экспрессии донорной ДНК, по 100 нг каждой фланкирующей последовательности донорной ДНК и 750 нг кассеты для экспрессии направляющей РНК INT70 (SEQ ID NO: 55).

Кассеты для экспрессии донорной ДНК и фланкирующие последовательности ДНК собираются в линейный отрезок ДНК через гомологичные коннекторные последовательности в 50 п.н., что позволяет встраивание всей донорной ДНК в целевой локус INT70, как показано на фиг. 1. Интеграционный сайт INT70 находится в некодирующей области между AAD14 (YNL331c) и GYP1 (YNL330c), расположенными на хромосоме XV в геноме CEN.PK.

Таблица 8. Сводка экспериментов по трансформации (“№”), проведенных в этом примере. Для трансформации использовали кассету для экспрессии DmBCO (SEQ ID NO: 33), кассету для экспрессии HsRDH12 (SEQ ID NO: 34), кассету для экспрессии LmATF1 дикого типа (SEQ ID NO:35) или кассеты для экспрессии мутантных LmATF1 (SEQ ID NO: 36-42) вместе с фланкирующими последовательностями донорной ДНК (SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 54).

№	Трансформированная ATF	Кассеты для экспрессии донорной ДНК (SEQ ID NOs)
1	LmATF1 wt	33; 34; 35
2	LmATF1_S480Q_V334L	33; 34; 36
3	LmATF1_S480Q_V407I	33; 34; 37
4	LmATF1_S480Q_G409A	33; 34; 38
5	LmATF1_S480Q_V407I_H69A	33; 34; 39
6	LmATF1_S480Q_G409A_V407I	33; 34; 40
7	LmATF1_S480Q_G409A_V407I_I484L	33; 34; 41
8	LmATF1_S480Q_G409A_V407I_H69A_I484L	33; 34; 42

Трансформационные смеси высевали на YPD-агар (10 г/л дрожжевого экстракта, 20 г/л пептона, 20 г/л декстрозы, 20 г/л агара), содержащий 200 мкг/мл нурсеотрицина (NatMX, Jena Bioscience, Германия) и 200 мкг/мл G418 (Sigma Aldrich, Zwijndrecht, Нидерланды). В качестве альтернативы вместо 20 г/л декстрозы использовали 20 г/л ксилозы в качестве источника углерода в YP-агаре. После инкубации при 30°C на трансформационных чашках появлялись колонии.

Эксперименты по росту и анализы. Для проверки продукции ретинилацетата при использовании глюкозы или ксилозы в качестве источника углерода действовали по следующей методике. Сначала трансформанты, полученные в экспериментах по трансформации, приведенных в табл. 8, индивидуально инокулировали во встряхиваемые колбы, содержащие 10 мл среды YP (10 г/л дрожжевого экстракта, 20 г/л пептона) с добавлением 2% глюкозы или 2% ксилозы в качестве источника углерода, и выращивали в инкубаторе на качалке при 30°C и 250 об/мин до появления достаточного роста. После этого переносили аликвоты предварительных культур на глюкозе или ксилозе в 10 мл среды YP во встряхиваемых колбах с добавлением 2% ксилозы так, чтобы оптическая плотность составляла от 0,1 до 1,0. Также переносили аликвоты предварительных культур на глюкозе в 10 мл среды YP во встряхиваемых колбах с добавлением 2% глюкозы так, чтобы оптическая плотность составляла от 0,1 до 1,0. В качестве встряхиваемых колб можно использовать встряхиваемые колбы с дефлекторами или без них. На жидкие культуры наслаивали 500 мкл минерального масла (Drakeol 5, Penreco, Karns City, PA, США). Культуры выращивали в качалочном инкубаторе от двух до четырех дней при 30°C при скорости качалки от 250 до 800 об/мин. Из культур извлекали масляную фракцию и проводили анализ на обратнофазовой колонке для UPLC с матричным фотодиодным детектором, как описано в Примере 1.

В качестве альтернативы трансформанты тестировали, как описано Sun et al. (ACS Synth Biol. 8(9), p. 2131-2140, 2019).

В каждом из описанных в табл. 8 экспериментов по трансформации сравнивали продукцию ретинилацетата из ксилозы и из глюкозы в трансформантах, полученных из pRN1014. Как и ожидалось, содержание ретинилацетата повышается при экспрессии мутантных ATF1 в *S. cerevisiae*, растущих на ксилозе, по крайней мере в таких же пределах, как при выращивании на глюкозе или галактозе.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Модифицированный фермент, участвующий в ацетилировании ретинола до ретинилацетата, в частности грибковый фермент, содержащий одну или несколько аминокислотных замен в последовательности, которая по меньшей мере на 20%, как-то 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:1, причем данная одна или несколько аминокислотных замен располагаются 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 по SEQ ID NO:1.

2. Модифицированный фермент по п. 1, содержащий одну аминокислотную замену, расположенную в положении, соответствующем аминокислотному остатку, выбранному 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 и 526 в полипептиде по SEQ ID NO:1.

3. Модифицированный фермент по п. 1 или 2, содержащий по меньшей мере две аминокислотные замены в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам, выбранным из 480 и 409, 480 и 407 или 407 и 409 в полипептиде по SEQ ID NO:1.

4. Модифицированный фермент по п. 3, дополнительно содержащий одну или несколько аминокислотных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам, выбранным из группы, состоящей из положений 68, 69, 72, 311, 334, 484 и их комбинаций в полипептиде по SEQ ID NO:1.

5. Модифицированный фермент по любому из пп. 1-4, при этом соответствующий остаток в положении 480 заменен на лизин или глутамин, соответствующий остаток в положении 409 заменен на аланин, соответствующий остаток в положении 407 заменен на изолейцин, соответствующий остаток в положении 69 заменен на аланин, аспарагин или серин, а также необязательно содержится лизин в положении 72 и/или изолейцин в положении 311 и/или треонин в положении 68 и/или лейцин в положении 334 и/или лейцин в положении 484.

6. Модифицированный фермент по любому из пп. 1-5, при этом активность по превращению или ацетилированию ретинола в ретинилацетат повышается в пределах от 0,2 до 4 раз по сравнению с соответствующим ферментом ацетилирования ретинола без такой одной или нескольких аминокислотных замен.

7. Модифицированный фермент по любому из пп. 1-6, который экспрессируется в

продуцирующей ретинол клетке-хозяине, предпочтительно в грибковой клетке-хозяине, более предпочтительно выбранной из *Yarrowia* или *Saccharomyces*.

8. Модифицированный фермент по любому из пп. 1-7, содержащий сильно консервативную частичную аминокислотную последовательность из по меньшей мере 7 аминокислотных остатков, выбранных из [NDEHCS]-H-x(3)-D-[GA], соответствующих остаткам от N218 до G224 в полипептиде по SEQ ID NO:1, причем этот мотив приведен в синтаксисе Prosite, а “x” означает произвольную аминокислоту, причем центральный гистидин входит в состав связывающего кармана фермента, а мотив из 7 аминокислот предпочтительно выбран из [NDE]-H-x(3)-D-[GA], более предпочтительно из [ND]-H-x(3)-D-[GA], наиболее предпочтительно из N-H-x(3)-D-[GA], что соответствует положениям от N218 до G224 в полипептиде по SEQ ID NO:1.

9. Продуцирующая ретиноид клетка-хозяин, предпочтительно грибковая клетка-хозяин, содержащая и способная экспрессировать модифицированный фермент по любому из пп. 1-8.

10. Способ получения ретиноидов, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 9 в подходящей культуральной среде с источником углерода, выбранным из глюкозы, фруктозы, рафинозы, лактозы, галактозы, глицерина, ксилозы, арабинозы, сахарозы или мальтозы, предпочтительно выбранным из глюкозы, галактозы или ксилозы.

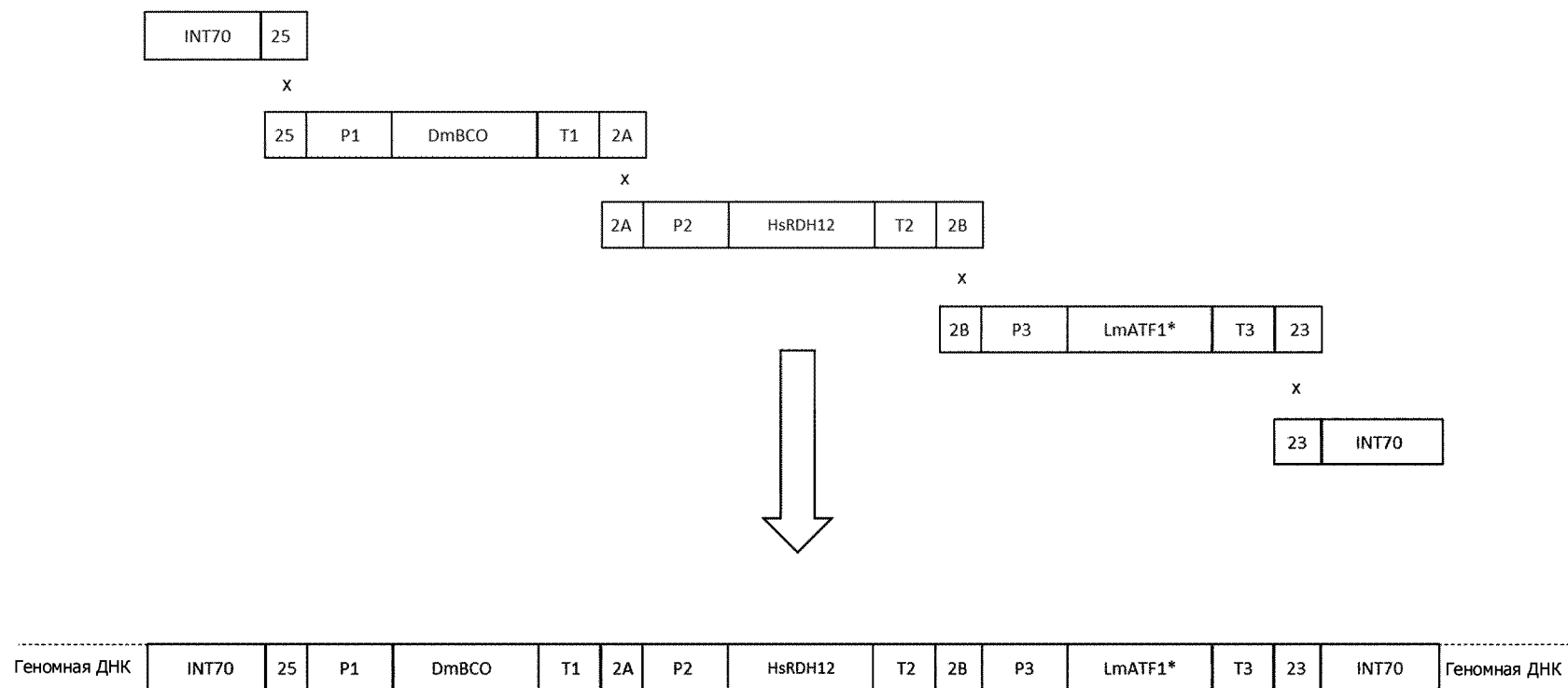
11. Способ по п. 10, при этом содержание ретинилацетата при использовании клетки-хозяина, экспрессирующей модифицированный фермент по любому из пп. 1-7, повышается от 0,2 до 4 раз по сравнению с клеткой-хозяином, содержащей соответствующий немодифицированный фермент.

12. Способ получения ретинилацетата, включающий получение продуцирующей ретинол клетки-хозяина по п. 9, культивирование данной клетки-хозяина в подходящей культуральной среде в соответствующих условиях культивирования и необязательно выделение и/или очистку ретинилацетата из среды.

13. Способ повышения степени конверсии ретинола в ретинилацетат по меньшей мере в 0,3 раза в продуцирующей ретинол клетке-хозяине, включающий трансформирование данной клетки-хозяина, предпочтительно грибковой клетки-хозяина, более предпочтительно клетки-хозяина, выбранных из *Yarrowia* или *Saccharomyces*, модифицированным ферментом по любому из пп. 1-8.

14. Способ повышения общей продукции ретиноидов по меньшей мере в 2 раза в продуцирующих ретинол клетке-хозяина, включающий трансформирование данной клетки-хозяина, предпочтительно грибковой клетки-хозяина, более предпочтительно

клетки-хозяина, выбранных из *Yarrowia* или *Saccharomyces*, модифицированным ферментом по любому из пп. 1-8.



Фиг. 1