

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291725** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.08.10

(51) Int. Cl. *C12N 9/20* (2006.01)
A61K 8/67 (2006.01)
C12N 1/14 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.12.18

(54) **ШТАММ С МОДИФИЦИРОВАННЫМИ ЛИПАЗАМИ**

(31) **01716/19; 20187829.5**

(72) Изобретатель:

(32) **2019.12.30; 2020.07.27**

Макмэхон Дженна, Кои Элвин Ирсан,

(33) **СН; ЕР**

Бу Лиан, Де Йонг Рене Марсель, Виас

(86) **РСТ/ЕР2020/087018**

Валмик Канубхай, Хьюстон Питер

(87) **WO 2021/136689 2021.07.08**

Луис (СН)

(71) Заявитель:

(74) Представитель:

ДСМ АйПи АССЕТС Б.В. (NL)

Фелицына С.Б. (RU)

(57) Изобретение относится к клетке-хозяину, продуцирующей ретиноиды, в частности к масляным дрожжам, модифицированным таким образом, что процентное содержание ретинилацетата в пересчете на общее количество ретиноидов, продуцируемых такой клеткой-хозяином, увеличивается во время ферментации с использованием триглицеридных масел, таких как, например, растительное масло, в качестве источника углерода, где активность некоторых эндогенных гидролаз или трансфераз, участвующих в нежелательных превращениях ретинола или ацетата ретинола, снижена или устранена. В частности, такая модифицированная клетка-хозяин может быть полезна в биотехнологическом способе получения витамина А.

A1

202291725

202291725

A1

ШТАММ С МОДИФИЦИРОВАННЫМИ ЛИПАЗАМИ

Настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, продуцирующей ретиноиды, в частности к масляным дрожжам, модифицированным таким образом, что процентное содержание ретинилацетата в пересчете на общее количество ретиноидов, продуцируемых такой клеткой-хозяином, увеличивается во время ферментации с использованием триглицеридных масел, таких как, например, растительное масло, в качестве источника углерода, причем активность некоторых эндогенных гидролаз или трансфераз, участвующих в нежелательных превращениях ретинола или ацетата ретинола, снижена или устранена. В частности, такая модифицированная клетка-хозяин может быть полезна в биотехнологическом способе получения витамина А.

Ретиноиды, в том числе витамин А, являются одним из очень важных и незаменимых питательных факторов для человека, который должен поступать с пищей.

Ретиноиды улучшают самочувствие человека, в частности, в отношении зрения, иммунной системы и роста. Ретинилацетат является важным промежуточным продуктом или предшественником в процессе получения витамина А.

Существующие способы химического производства ретиноидов, включая витамин А и его предшественники, имеют некоторые нежелательные характеристики, такие как, например, высокое потребление энергии, сложные стадии очистки и/или нежелательные побочные продукты. Поэтому за последние десятилетия были исследованы другие подходы получения ретиноидов, включая витамин А и его предшественники, включающие стадии микробной конверсии, которые могли бы привести к более экономичному, а также экологичному получению витамина А.

В общем, биологические системы, производящие ретиноиды, не поддаются промышленной обработке и/или производят соединения в таких малых количествах, что их выделение в промышленных масштабах нецелесообразно. К наиболее ограничивающим факторам относятся нестабильность промежуточных продуктов в таких биологических системах и/или относительно высокое образование побочных продуктов, таких как, например, ретиниловые сложные эфиры жирных кислот, особенно с использованием масляных клеток-хозяев, выращенных на растительных маслах, используемых в качестве источника углерода.

WO 2019/058000 описывает новый ферментативный процесс от бета-каротина до ретинола и ретинилацетата, промежуточного соединения, которое считается более стабильным, чем ретинол, с использованием каротиноид-продуцирующей клетки-хозяина, выращенной на растительном кукурузном масле, причем указанная клетка-хозяин

экспрессирует гетерологичную бета-каротиноксидазу (BCO), ретиналь-редуктазу (RDH) и ацетилтрансферазу (ATF). Однако относительно высокий процент ретинола, продуцируемого такой масляной клеткой-хозяином, «теряется» при производстве витамина А, т.е. превращается в нежелательные побочные продукты, катализируемые эндогенными гидролазами и/или трансферазами клетки-хозяина.

Таким образом, постоянной задачей является улучшение специфичности продукта и/или производительности ферментативных процессов для превращения ретинола в ретинилацетат, стабильный промежуточный продукт в производстве витамина А. В частности, желательно разработать ферментативный процесс с использованием предпочтительно масляных клеток-хозяев, растущих на растительном масле, с ограниченным образованием побочных продуктов и максимальным накоплением ретинилацетата без ущерба для роста клетки-хозяина.

Неожиданно авторы изобретения обнаружили, что модификация клетки-хозяина, особенно масляных дрожжей, а именно модификация, в частности блокировка, определенных ферментов, участвующих в предварительном гидролизе растительного масла в глицерин и жирные кислоты, может привести к увеличению образования ретинилацетата, т.е. процентное содержание ретинилацетата в расчете на общее количество ретиноидов может быть увеличено по меньшей мере на около 30%, например, до процентного содержания в диапазоне около 70-90% и более, по сравнению со способом, в котором используется соответствующая немодифицированная клетка-хозяин.

В частности, настоящее изобретение направлено на клетку-хозяин, продуцирующую ретиноид, способную к образованию ретинилацетата, такую как грибная клетка-хозяин, предпочтительно клетка масляных дрожжей, таких как, например, *Yarrowia*, включающую одну или несколько генетических модификаций, т.е. снижение или устранение, предпочтительно устранение, определенных эндогенных генов, кодирующих ферменты гидролазы или трансферазы, в частности, включая, например, гены, кодирующие эндогенные липазы и/или эстеразы, включая, без ограничения указанным, модификацию активности эндогенного гена, идентичного по меньшей мере на около 50%, например, 60, 70, 80, 90, 95, 98 или 100% SEQ ID NO:5, где SEQ ID NO:5 соответствует LIP8, полученной из *Yarrowia lipolytica*.

В одном аспекте настоящее изобретение направлено на способ ферментации с использованием такой модифицированной клетки-хозяина, определенной в данном описании, причем указанная клетка-хозяин выращивается на триглицеридных маслах, таких как, например, растительное масло, таком как, например, растительное кукурузное масло, в качестве источника углерода, где образование ретинилацетата в результате

превращения ретинола увеличивается, что приводит к процентному содержанию по меньшей мере около 70%, например, около 75, 80, 85, 90, 95, 98% или более, включая 100%, ретинилацетата в пересчете на общее количество ретиноидов, присутствующих в или продуцируемых указанной модифицированной клеткой-хозяином.

Подходящие эндогенные гидролазы или трансферазы, подлежащие модификации в соответствии с настоящим изобретением, могут быть выбраны из ферментов с липазной и/или эстеразной активностью. Термин «липаза» используется в данном описании взаимозаменяемо с термином «эстераза» или «фермент, обладающий липазной и/или эстеразной активностью». Это относится к ферментам, участвующим в предварительном гидролизе триглицеридных масел, таких как, например, растительное масло, в глицерин и жирные кислоты, которые обычно экспрессируются в масляных клетках-хозяевах. Подходящие ферменты для модификации в клетке-хозяине, как определено в настоящем описании, могут быть выбраны из эндогенных ферментов, принадлежащих к классу EC 3.1.1., включая, без ограничения указанным, один или несколько ферментов с активностью, соответствующей активностям LIP2, LIP3, LIP8, TGL1, LIP16, LIP17, LIP18 или LIP4 Yarrowia.

Используемый в данном описании термин «фермент, обладающий активностью, соответствующей активности LIP Yarrowia», включает не только ферменты, происходящие из Yarrowia, т.е. Yarrowia lipolytica, например, LIP2, LIP3, LIP8, TGL-1, LIP16, LIP17, LIP18, LIP4 из Yarrowia или их комбинации, но также включает ферменты, обладающие эквивалентной ферментативной активностью, но происходящие из другого организма-источника, в частности из масляной клетки-хозяина, продуцирующей ретинилацетат, где модификация соответствующих эквивалентных эндогенных генов приведет к увеличению превращения ретинола в ретинилацетат, как определено в данном описании.

Настоящее изобретение направлено на клетку-хозяин, в которой модифицирована определенная активность эндогенных гидролаз/трансфераз, приводящая к увеличению содержания ретинилацетата в процессе ферментации витамина А, как определено в данном описании. Подходящие клетки-хозяева, подлежащие модификации, выбирают из клеток-хозяев, продуцирующих ретиноид, в частности клеток-хозяев, продуцирующих ретинилацетат, где ретинилацетат образуется в результате ферментативного превращения ретинола, катализируемого ацетилирующими ферментами (ATF), например, грибных клеток-хозяев, включая клетки масляных дрожжей, таких как, например, Rhodosporidium, Lipomyces или Yarrowia, предпочтительно Yarrowia, более предпочтительно Yarrowia lipolytica, где превращение ретинола в ретинилацетат усиливается, что приводит к

увеличению процентного содержания ретинилацетата в расчете на общее количество ретиноидов в клетке, которое увеличивается по меньшей мере на около 10% за счет модификации активности указанного эндогенного фермента, такой как активность липазы и/или эстеразы, как определено в настоящем описании, и где модификация включает генетическую модификацию, такую как, например, снижение/устранение активности эндогенных генов, кодирующих определенные липазы/эстеразы *Yarrowia*, или активности соответствующих эндогенных ферментов из других масляных клеток-хозяев, как указано в настоящем описании, включая, без ограничения указанным, делецию соответствующих генов.

Как определено в настоящем описании, «модифицированная клетка-хозяин» сравнивается с «клеткой-хозяином дикого типа», т.е. соответствующей клеткой-хозяином без такой модификации определенных ферментативных активностей, т.е. где указанный соответствующий эндогенный фермент (все еще) экспрессируется и активен *in vivo*.

В одном воплощении настоящее изобретение относится к модифицированной клетке-хозяину, такой как модифицированная масляная клетка-хозяин, продуцирующая ретинилацетат, содержащая модификацию полипептида, идентичного по меньшей мере на около 50%, например, 60, 70, 80, 90, 95, 98, или 100% SEQ ID NO:5, включая, без ограничения указанным, полипептида LIP8, полученного из *Yarrowia lipolytica*, где активность указанного полипептида снижена или устранена, предпочтительно устранена, включая снижение или устранение экспрессии гена, при этом применение такой модифицированной клетки-хозяина при ферментации в присутствии триглицеридных масел, таких как, например, растительное кукурузное масло, в качестве источника углерода, приводит к повышенному процентному содержанию ретинилацетата в результате превращения ретинола, такому как по меньшей мере около 70% ретинилацетата в расчете на общее количество ретиноидов, присутствующих в соответствующей клетке-хозяине, как определено в настоящем описании. В частности, клетка-хозяин выбрана из *Yarrowia*, такой как *Yarrowia lipolytica*, в которой активность LIP8 согласно SEQ ID NO:5, включая полипептид, кодируемый полинуклеотидом согласно SEQ ID NO:6, снижена или устранена, предпочтительно устранена, что приводит к получению около 30% или более ретинилацетата в расчете на общее количество ретиноидов в клетке-хозяине. LIP8 согласно SEQ ID NO:5 получена из RefSeq YALI0_B09361g. Снижение или устранение LIP8 или соответствующего фермента из других масляных дрожжей, как определено в данном описании, может сочетаться с уменьшением или устранением дополнительных эндогенных ферментов, включая, без ограничения указанным, ферменты с активностью, эквивалентной LIP2, LIP3, TGL1,

LIP16, LIP17, LIP18 или LIP4 из *Yarrowia*, включая ферменты, последовательность которых по меньшей мере на около 50% идентична любой последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, 3, 7, 9, 11, 13, 15 и их комбинаций.

В одном воплощении настоящее изобретение относится к модифицированной клетке-хозяину, такой как модифицированная масляная клетка-хозяин, продуцирующая ретинилацетат, содержащая модификацию полипептида идентичного по меньшей мере на около 50%, например, 60, 70, 80, 90, 95, 98, или 100% SEQ ID NO:1, включая, без ограничения указанным, полипептид LIP2, полученный из *Yarrowia lipolytica*, где активность указанного полипептида снижена или устранена, предпочтительно устранена, включая снижение или устранение экспрессии гена, при этом применение такой модифицированной клетки-хозяина при ферментации в присутствии триглицеридных масел, таких как, например, растительное кукурузное масло, в качестве источника углерода приводит к повышенному процентному содержанию ретинилацетата в результате превращения ретинола, такому как по меньшей мере около 70% ретинилацетата в расчете на общее количество ретиноидов, присутствующих в соответствующей клетке-хозяине, как определено в настоящем описании. В частности, клетка-хозяин выбрана из *Yarrowia*, такой как *Yarrowia lipolytica*, в которой активность LIP2 согласно SEQ ID NO:1, включая полипептид, кодируемый полинуклеотидом согласно SEQ ID NO:2, снижена или устранена, предпочтительно устранена, что приводит к получению около 30% или более ретинилацетата в расчете на общее количество ретиноидов в клетке-хозяине. LIP2 по SEQ ID NO:1 получена из RefSeq YALI0_B09361g. Снижение или устранение LIP2 или соответствующего фермента из других жировых дрожжей, как определено в данном описании, может сочетаться с уменьшением или устранением других эндогенных ферментов, включая, без ограничения указанным, ферменты с активностью, эквивалентной активности LIP8, LIP3, TGL1, LIP16, LIP17, LIP18 или LIP4 из *Yarrowia*, включая ферменты, последовательность которых по меньшей мере на около 50% идентична любой последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:5, 3, 7, 9, 11, 13, 15 и их комбинаций.

В другом воплощении настоящее изобретение относится к модифицированной клетке-хозяину, такой как модифицированная масляная клетка-хозяин, продуцирующая ретинилацетат, содержащая модификацию полипептида, идентичного по меньшей мере на около 50%, например, 60, 70, 80, 90, 95, 98, или 100% SEQ ID NO:3, включая, без ограничения указанным, полипептид LIP3, полученный из *Yarrowia lipolytica*, где активность указанного полипептида снижена или устранена, предпочтительно устранена, включая снижение или устранение экспрессии гена, при этом применение такой

модифицированной клетки-хозяин при ферментации в присутствии триглицеридных масел, таких как, например, растительное кукурузное масло в качестве источника углерода приводит к повышенному процентному содержанию ретинилацетата в результате превращения ретинола, такому как по меньшей мере около 70% ретинилацетата в расчете на общее количество ретиноидов, присутствующих в соответствующей клетке-хозяине, как определено в настоящем описании. В частности, клетка-хозяин выбрана из *Yarrowia*, такой как *Yarrowia lipolytica*, в которой активность LIP3 согласно SEQ ID NO:3, включая полипептид, кодируемый полинуклеотидом согласно SEQ ID NO:4, снижена или устранена, предпочтительно устранена, что приводит к получению около 30% или более ретинилацетата в расчете на общее количество ретиноидов в клетке-хозяине. LIP8 по SEQ ID NO:3 получена из RefSeq YAL10_B09361g. Снижение или отмена LIP3 или соответствующего фермента из других жировых дрожжей, как определено в данном описании, может сочетаться с уменьшением или отменой других эндогенных ферментов, включая, без ограничения указанным, ферменты с активностью, эквивалентной активности LIP8, LIP2, TGL1, LIP16, LIP17, LIP18, или LIP4 из *Yarrowia*, включая ферменты, последовательность которых по меньшей мере на около 50% идентична любой последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:5, 1, 7, 9, 11, 13, 15 и их комбинаций.

В другом воплощении настоящее изобретение относится к модифицированной клетке-хозяину, такой как модифицированная масляная клетка-хозяин, продуцирующая ретинилацетат, содержащая модификацию полипептида, идентичного по меньшей мере на около 50%, например, 60, 70, 80, 90, 95, 98, или 100% SEQ ID NO:15, включая, без ограничения указанным, полипептид LIP4, полученный из *Yarrowia lipolytica*, где активность указанного полипептида снижена или устранена, предпочтительно устранена, включая снижение или устранение экспрессии гена, при этом применение такой модифицированной клетки-хозяина при ферментации в присутствии триглицеридных масел, таких как, например, растительное кукурузное масло в качестве источника углерода приводит к повышенному процентному содержанию ретинилацетата в результате превращения ретинола, такому как по меньшей мере около 70% ретинилацетата в расчете на общее количество ретиноидов, присутствующих в соответствующей клетке-хозяине, как определено в настоящем описании. В частности, клетка-хозяин выбрана из *Yarrowia*, такой как *Yarrowia lipolytica*, в которой активность LIP4 согласно SEQ ID NO:15, включая полипептид, кодируемый полинуклеотидом согласно SEQ ID NO:16, снижена или устранена, предпочтительно устранена, что приводит к получению около 30% или более ретинилацетата в расчете на общее

количество ретиноидов в клетке-хозяине. LIP8 по SEQ ID NO:15 получена из RefSeq YALI0_B09361g. Снижение или устранение LIP4 или соответствующего фермента из других масляных дрожжей, как определено в данном описании, может сочетаться с уменьшением или устранением дополнительных эндогенных ферментов, включая, без ограничения указанным, ферменты с активностью, эквивалентной активности LIP8, LIP2, LIP3, TGL1, LIP16, LIP17 или LIP18 из *Yarrowia*, включая ферменты, последовательность которых по меньшей мере на около 50% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 1, 3, 7, 9, 11, 13 и их комбинаций.

В соответствии с дополнительными воплощениями настоящее изобретение относится к модифицированной клетке-хозяину, такой как модифицированная масляная клетка-хозяин, продуцирующая ретинилацетат, включающая модификацию полипептида, выбранного из группы, состоящей из полипептидов, идентичных по меньшей мере на около 50%, например, 60, 70, 80, 90, 95, 98 или 100% SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13 и их комбинациям; включая, без ограничения указанным, фермент, получаемый из *Yarrowia lipolytica*, выбранный из группы, состоящей из TGL1, LIP16, LIP17, LIP18 и их комбинаций; при этом активность указанного(ых) полипептида(ов) снижена или устранена, предпочтительно устранена, включая снижение или устранение экспрессии генов, где культивирование такой модифицированной клетки-хозяина в присутствии триглицеридных масел, таких как, например, растительное кукурузное масло, в качестве источника углерода, приводит к повышенному процентному содержанию ретинилацетата в результате превращения ретинола, такому как по меньшей мере около 70% ретинилацетата в расчете на общее количество ретиноидов, присутствующих в соответствующей клетке-хозяине, как определено в настоящем описании. В частности, клетка-хозяин выбрана из *Yarrowia*, такой как *Yarrowia lipolytica*, где активность фермента, выбранного из TGL1, LIP16, LIP17, LIP18 или их комбинаций согласно SEQ ID NO:7, 9, 11, 13, включая полипептид(ы), кодируемый(ые) полинуклеотидом(ами) согласно SEQ ID NO:8, 10, 12, 14, снижена или устранена, предпочтительно устранена, что приводит к получению около 30% или более ретинилацетата в расчете на общее количество ретиноидов в клетке-хозяине. LIP8 согласно SEQ ID NO:7 получена из RefSeq YALI0_B09361g. LIP16 согласно SEQ ID NO:9 получена из RefSeq YALI0_B09361g. LIP17 согласно SEQ ID NO:11 получена из RefSeq YALI0_B09361g. LIP18 согласно SEQ ID NO:13 получена из RefSeq YALI0_B20350g. Снижение или устранение активности фермента, выбранного из группы, состоящей из TGL1, LIP16, LIP17, LIP18 и их комбинаций, или соответствующего фермента из других масляных дрожжей, как определено в настоящем описании, может быть объединена с уменьшением или

устранением дополнительных эндогенных ферментов, включая, без ограничения указанным ферменты с активностью, эквивалентной активности LIP8, LIP2, и/или LIP3, и/или LIP4 из Yarrowia, включая ферменты, последовательность которых, по меньшей мере, на около 50% идентична любой последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:5, 1, 3, 15 и их комбинаций.

Предпочтительно, модифицированная клетка-хозяин по настоящему изобретению включает модификацию фермента с активностью фермента, идентичного по меньшей мере на около 50% с LIP8 SEQ ID NO:5, такого как полученный из Yarrowia, или фермента из другой клетки-хозяина с активностью, эквивалентной LIP8 из Yarrowia, как определено в настоящем описании, что приводит к процентному содержанию ретинилацетата в расчете на общее количество ретиноидов в диапазоне около 70-90% или более, например, в таком способе, в котором клетку-хозяин выращивают в присутствии триглицеридных масел, таких как, например, растительное кукурузное масло, в качестве источника углерода. Кроме того, может быть увеличено процентное содержание ретинилацетата, например, по меньшей мере на около 10% в расчете на общее количество ретиноидов, например, в таком способе, в котором клетку-хозяин выращивают в присутствии триглицеридных масел, таких как, например, кукурузное масло в качестве источника углерода с комбинацией дополнительных модификаций активности эндогенных ферментов в клетке-хозяине. Особенно предпочтительными являются комбинации с дополнительными модификациями, такими как, например, модификация активности фермента, идентичного по меньшей мере на около 50% LIP2, и/или LIP3, и/или LIP4 SEQ ID NO:1, или 3, или 15, например, полученных из Yarrowia, или ферментов из другой клетки-хозяина с активностью, эквивалентной LIP2, и/или LIP3, и/или LIP4 из Yarrowia. Дальнейшее увеличение процентного содержания ретинилацетата в пересчете на общее количество ретиноидов может быть возможным путем введения одной или нескольких модификаций активности одного или нескольких ферментов, идентичных по меньшей мере на около 50% ферменту, выбранному из группы, состоящей из TGL1, LIP16, LIP17, LIP18 и их комбинаций согласно SEQ ID NO:7, 9, 11, 13, например, полученных из Yarrowia или ферментов из другой клетки-хозяина с активностью, эквивалентной ферменту, выбранному из группы, состоящей из TGL1, LIP16, LIP17 и LIP18 из Yarrowia.

Используемый в данном описании термин «активность» фермента, в частности активность гидролазы или трансферазы, включая активность липаз или эстераз, как определено в настоящем описании, определяется как «специфическая активность», т.е. его каталитическая активность, т.е. его способность катализировать образование продукта из

заданного субстрата, например, образование ретиниловых эфиров жирных кислот. Фермент, т.е. липаза или эстераза является активной, если она проявляет свою каталитическую активность *in vivo*, т.е. внутри клетки-хозяина, как определено в данном описании, или внутри системы в присутствии подходящего субстрата. Специалисту в данной области техники известно, как измерить активность фермента, в частности активность липаз, как определено в данном описании, включая, без ограничения указанным, фермент с активностью, соответствующей LIP2 и/или LIP3 и/или LIP8 и/или TGL1 и/или LIP16 и/или LIP17 и/или LIP18 и/или LIP4 из Yarrowia. Аналитические способы для оценки способности липаз/эстераз, как определено в данном описании, участвовать в образовании ретиниловых эфиров жирных кислот, известны в данной области техники и включают измерение с помощью ВЭЖХ и т.п. Что касается активности LIP2, LIP3, LIP4, LIP8, TGL1, LIP16, LIP17 и/или LIP18, как определено в настоящем описании, специалист в данной области может измерить образование ретиниловых эфиров жирных кислот в результате превращения ретинола по сравнению с образованием ретинилацетата в результате превращения ретинола с использованием как модифицированной клетки-хозяина, так и клетки-хозяина дикого типа.

Используемое в данном описании понятие «фермент», в частности, липаза или эстераза, как определено в настоящем описании, обладающий «сниженной или устраненной» активностью, означает снижение его специфической активности, то есть сниженную/устраненную способность катализировать образование продукта из данного субстрата, например, превращение триглицеридов, таких как, например, растительное масло, предпочтительно кукурузное масло, в глицерин и жирные кислоты во время ферментации, включая снижение или устранение активности соответствующего (эндогенного) гена, кодирующего такие липазы или эстеразы. Уменьшение на 100% упоминается в данном описании как устранение ферментативной активности, достигаемое, например, посредством делеции, вставок, мутаций со сдвигом рамки считывания, миссенс-мутаций или преждевременных стоп-кодонов в эндогенном гене, кодирующем указанный фермент, или блокирования экспрессии и/или активности указанного эндогенного(ых) гена(ов) известными способами.

Используемый в данном описании термин «делеция» гена, приводящая к отмене активности гена, включает все мутации в последовательности нуклеиновой кислоты, которые могут привести к уменьшению функции аллеля, включая, без ограничения указанным, делеции, вставки, мутации со сдвигом рамки считывания, миссенс-мутации и преждевременные стоп-кодоны, где удаление означает, что соответствующая активность гена/белка, такая как, в частности, активность эндогенной липазы, не может быть

обнаружена (больше не обнаруживается) в клетке-хозяине.

В одном конкретном воплощении настоящее изобретение относится к модифицированной клетке-хозяину, как определено в данном описании, способной к образованию ретинилацетата, где образование ретинилацетата увеличивается во время ферментации по сравнению с образованием ретинилацетата с использованием соответствующей немодифицированной клетки-хозяина. В данном описании повышенное образование ретинилацетата означает процентное содержание по меньшей мере около 30%, такое как, например, около 75, 80, 85, 90, 95, 98% или более, включая 100%, ретинилацетата в пересчете на общее количество ретиноидов, присутствующих в/продуцируемых указанной модифицированной клеткой-хозяином.

Таким образом, настоящее изобретение направлено на модифицированную клетку-хозяин, продуцирующую ретиноид, в частности грибную клетку-хозяин, продуцирующую ретинилацетат, в которой процентное содержание ретинилацетата в расчете на общее количество ретиноидов, продуцируемых указанной клеткой-хозяином, находится по меньшей мере в диапазоне около 70-90%, например, по меньшей мере около 70%, например, около 75, 80, 85, 90, 95, 98% или более, включая 100%, по сравнению с соответствующей немодифицированной клеткой-хозяином, и где указанная модификация означает снижение или устранение активности эндогенной липазы или эстеразы, включая, без ограничения указанным, соответствующую активность LIP8 из *Yarrowia*, и необязательно, кроме того, соответствующую активность LIP2, и/или LIP3, и/или LIP4, и/или TGL1, и/или LIP16, и/или LIP17, и/или LIP18 из *Yarrowia*.

Клетка-хозяин, подлежащая модификации согласно настоящему изобретению, может быть выбрана из *Yarrowia lipolytica*, как описано в WO 2019/058001 или WO 2019/057999, где образование ретинилацетата из бета-каротина оптимизировано посредством гетерологичной экспрессии бета-каротиноксидаз (BCO), ретинолдегидрогеназ (RDH) и/или ацетилтрансфераз (ATF). В частности, модифицированная клетка-хозяин, как определено в настоящем описании, может экспрессировать BCO, происходящую из *Drosophila melanogaster*, RDH, происходящую из *Fusarium fujikuroi*, и грибную ATF, такую как, например, ATF происходящую из *Lachancea* или *Saccharomyces*. Для усиления превращения продуцируемого клеткой-хозяином бета-каротина в ретиналь, в ретинол и в ретинилацетат, указанные ферменты могут включать одну или несколько мутаций, приводящих к улучшенному ацетилированию ретинола в ретинилацетат.

Введение модификации(модификаций) в клетку-хозяин, продуцирующую ретиноид, с целью синтеза меньшего числа или с целью прекращения синтеза копий генов

и/или белков, таких как липазы или эстеразы, и соответствующих генов, как определено в настоящем описании, включая создание модифицированной подходящей клетки-хозяина, способной к образованию ретинилацетата, как определено в настоящем описании, со сниженной/устраненной активностью ферментов, соответствующих LIP8 из *Yarrowia*, необязательно дополнительно включающее сниженную/устраненную активность фермента(ов), соответствующих LIP2, и/или LIP3, и/или LIP4, и/или TGL1, и/или LIP16, и /или LIP17 и/или LIP18 из *Yarrowia*, может включать использование слабых промоторов или введение одной или нескольких мутаций (например, вставки, делеции/нокаутирования или точечной/со сдвигом рамки считывания/миссенс-мутации, преждевременных стоп-кодонов) в соответствующие ферменты (их части) (как описано в настоящем документе), в частности, в регуляторные участки ферментов, что приводит к снижению/устранению активности указанного фермента, например, его инактивации посредством мутагенеза *in vivo*, например, путем мутагенеза каталитических остатков или путем внесения мутаций или делеций, которые препятствуют фолдингу белка или расщеплению пре- или про-последовательности, необходимой для активации липазы/эстеразы при секреции клеткой-хозяином. Специалист в данной области техники знает, как генетически манипулировать или модифицировать клетку-хозяин, как определено в настоящем описании, что приводит к снижению/устранению такой активности, например, активности гидролазы/трансферазы, включая активность липазы или эстеразы, как определено в данном описании. Эти генетические манипуляции включают, без ограничения указанным, например, замену гена, амплификацию гена, разрушение гена, трансфекцию, трансформацию с использованием плазмид, вирусов или других векторов. Такая генетическая манипуляция может, например, влиять на взаимодействие с ДНК, которое опосредовано N-концевой областью ферментов, определенных в данном описании, или на взаимодействие с другими эффекторными молекулами. В частности, модификации, ведущие к уменьшению/устранению специфической ферментативной активности, могут быть осуществлены в функциональном участке белка, таком как участок, связанный с каталитической активностью. Кроме того, снижение/устранение специфической ферментативной активности может быть достигнуто контактированием указанных ферментов со специфическими ингибиторами или другими веществами, которые специфически с ними взаимодействуют. Чтобы идентифицировать такие ингибиторы, соответствующие ферменты, такие как, например, определенные липазы, как раскрыто в данном описании, могут быть экспрессированы и протестированы на активность в присутствии соединений, предположительно ингибирующих их активность.

Генерация мутации в нуклеиновых кислотах или аминокислотах, т.е. мутагенез, может осуществляться различными способами, такими как, например, случайный или сайт-направленный мутагенез, физическое повреждение, вызванное агентами, такими как, например, облучение, химическая обработка или введение генетического элемента. Квалифицированный специалист знает, как вводить мутации.

Модифицированная клетка-хозяин, способная продуцировать ретинилацетат в соответствии с настоящим изобретением, может включать дополнительные модификации, включая снижение или отмену дополнительной активности липазы или эстеразы, присутствующей в указанной клетке-хозяине, при условии, что модификации приводят к увеличению процентного содержания ретинилацетата в расчете на общее количество ретиноидов продуцируемых в процессе ферментации, как определено в данном описании, без ущерба для роста такой модифицированной клетки-хозяина.

Таким образом, настоящее изобретение, кроме того, включает способ идентификации эндогенных гидролаз, подлежащих модификации, такой как, например, путем снижения или отмены специфической ферментативной активности, включая липазы/эстеразы с активностью, соответствующей LIP8, и/или LIP2, и/или LIP3, и/или LIP4, и/или TGL, и/или LIP16, и/или LIP17, и/или LIP18 из *Yarrowia*, включая стадию сверхэкспрессии соответствующих эндогенных генов один за другим в подходящей клетке-хозяине, такой как, например, клетка-хозяин, продуцирующая ретинилацетат, чтобы увидеть, усиливает ли это негативный эффект, например, снижение процентного содержания ретинилацетата. Впоследствии можно уменьшить/устранить, например, инактивировать соответствующие гены, скажем, посредством делеции, воздействуя на активность тех ферментов, для которых сверхэкспрессия приводит к снижению ретинилацетата во время ферментации указанной клетки-хозяина, и отобрать клоны с повышенным образованием ретинилацетата.

Конкретное воплощение относится к способу идентификации подходящих эндогенных гидролаз/трансфераз, как определено в настоящем описании, и которые подлежат модификации в соответствии с настоящим изобретением, включающему стадии предварительного расщепления растительного масла до глицерола и жирных кислот, (1) отбора эндогенных ферментов липазы или эстеразы на основе гомологии последовательностей по меньшей мере на около 50%, а именно, например, 60, 70, 80, 90, 95, 98 или 100% с SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15

(2) сверхэкспрессии выбранных генов и сравнения процентного содержания ретинилацетата в пересчете на общее количество ретиноидов,

(3) отбора генов, сверхэкспрессия которых отрицательно влияет на процентное

содержание ретинилацетата в смеси ретиноидов, и

(4) снижения или устранения, т.е. инактивации, а именно, например, путем делеции выбранных генов, которые при сверхэкспрессии оказывают отрицательное влияние на образование ретинилацетата.

Согласно одному конкретному аспекту настоящего изобретения, модифицированная клетка-хозяин, как определено в данном описании, может быть использована в процессе уменьшения образования побочных продуктов при ферментации витамина А с увеличением процентного содержания ретинилацетата, присутствующего в ретиноидной смеси, продуцируемой клеткой-хозяином. Модифицированная клетка-хозяин, как определено в данном описании, может включать дополнительные модификации, включая введение (и экспрессию) гетерологичных полинуклеотидов, оптимизированных в отношении хозяина. Специалист в данной области техники знает, как получить такие модифицированные полинуклеотиды. Понятно, что такие молекулы нуклеиновой кислоты, оптимизированные в отношении хозяина, а также молекулы, содержащие так называемые молчащие мутации, включены в настоящее изобретение до тех пор, пока они все еще приводят к модифицированным клеткам-хозяевам, обладающим модифицированной активностью липазы/эстеразы, как определено в настоящем описании.

Термины «идентичность последовательности», «% идентичности» или «гомология последовательности» используются в данном описании как взаимозаменяемые. Для целей настоящего изобретения в данном описании определено, что для измерения процента гомологии последовательностей или идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух нуклеотидных последовательностей, последовательности выравнивают для целей оптимального сравнения. В целях оптимизации выравнивания между двумя последовательностями в любую из двух сравниваемых последовательностей могут быть внесены разрывы. Такое выравнивание может быть проведено по всей длине сравниваемых последовательностей. В ином случае, выравнивание может быть проведено на более коротком участке, например, длиной около 20, около 50, около 100 или более нуклеотидных остатков или аминокислот. Идентичность определяется как процент полных совпадений между двумя последовательностями по всей представленной выравненной области. Процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями или между двумя нуклеотидными последовательностями может быть определен с помощью алгоритма Нидлмана-Вунша для сравнения двух последовательностей (Needleman, S. B. and Wunsch, C. D. (1970) *J. Mol. Biol.* 48, 443-453). Как аминокислотные, так и нуклеотидные последовательности могут быть выравнены с помощью алгоритма. Алгоритм Нидлмана-Вунша был реализован в компьютерной

программе «NEEDLE». Для целей настоящего изобретения использовалась программа NEEDLE из пакета EMBOSS (версия 2.8.0 или выше, EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000) Rice, Longden and Bleasby, Trends in Genetics 16, (6) pp276—277, <http://emboss.bioinformatics.nl/>). Для белковых последовательностей в качестве подстановочной матрицы использовалась EBLOSUM62. Для нуклеотидной последовательности использовалась EDNAFULL. Использованными дополнительными параметрами являются штраф за открытие делеции равный 10 и штраф за продолжение делеции равный 0,5. Специалист поймет, что все эти различные параметры дадут несколько различающиеся результаты, но общий процент идентичности двух последовательностей не изменится значительно при использовании различных алгоритмов.

После описанного выше выравнивания программой «NEEDLE» процент идентичности между последовательностью запроса и последовательностью изобретения подсчитывается следующим образом: количество соответствующих положений в выравнивании, показывающее совпадающие аминокислоты или нуклеотиды в обеих последовательностях, делится на общую длину выравнивания после вычитания общего количества разрывов в выравнивании. Определенная согласно изобретению идентичность может быть получена при использовании «NEEDLE» с помощью опции «NOBRIEF» и отмечается в выходных данных программы как «longest-identity» (идентичность на участке с наибольшей длиной). Если обе сравниваемые аминокислотные последовательности не отличаются ни по одной из своих аминокислот, они идентичны или имеют 100% идентичность. Что касается ферментов, происходящих из растений, специалисту в данной области известно, что ферменты растительного происхождения могут содержать сигнал нацеливания на хлоропласты, который должен быть расщеплен специфическими ферментами, такими как, например, ферменты процессинга хлоропластов (CPE).

В одном воплощении настоящее изобретение включает применение модифицированной клетки-хозяина, как определено в настоящем описании, в процессе ферментации для получения ретинола и ретинилацетата, включающем стадию ферментативного превращения ретиналя, в частности, с процентным содержанием по меньшей мере около 65-90% транс-ретиналя в расчете на общее количество ретиноидов, продуцируемых такой клеткой-хозяином, посредством воздействия подходящих ретинолдегидрогеназ (RDH), а именно, например, как проиллюстрировано в WO 2019/057998. Необязательно ретинол выделяют и/или дополнительно очищают от ферментационной среды. Такой способ может включать дополнительные стадии, такие

как, например, ферментативное превращение бета-каротина в ретиналь под действием подходящих ВСО, предпочтительно ВСО с селективностью в отношении образования транс-ретинола, более предпочтительно приводящих к получению по меньшей мере около 65-90% транс-изоформ в расчете на общее количество ретиноидов, продуцируемых указанной клеткой-хозяином, а именно, например, как проиллюстрировано в WO 2019/057999. Таким образом, предпочтительный способ получения ретинола и/или ретинилацетата с использованием модифицированной клетки-хозяина, как определено в данном описании, включает стадии (1) ферментативного превращения бета-каротина в ретиналь под действием подходящих ВСО, (2) ферментативного превращения ретинола в ретинол под действием подходящих RDH и, необязательно, (3) выделения и/или очистки ретинола из ферментационной среды.

В одном воплощении настоящее изобретение включает применение модифицированной клетки-хозяина, как определено в настоящем описании, в процессе ферментации для получения ретинилацетата, включающем стадию ферментативного превращения ретинола под действием подходящих ацетилтрансфераз (ATF), а именно, например, как проиллюстрировано в WO2019/058001. Необязательно ретинилацетат выделяют и/или дополнительно очищают от ферментационной среды. Такой способ может включать дополнительные стадии, такие как, например, ферментативное превращение бета-каротина в ретиналь под действием подходящих ВСО, предпочтительно ВСО с селективностью в отношении образования транс-ретинола, более предпочтительно приводящих к получению по меньшей мере около 65-90% транс-изоформ в расчете на общее количество ретиноидов, продуцируемых указанной клеткой-хозяином, а именно, например, как проиллюстрировано в WO 2019/057999, и/или ферментативной конверсией ретинола, в частности, с процентным содержанием транс-ретинола по меньшей мере около 65-90% в расчете на общее количество ретиноидов, продуцируемых такой клеткой-хозяином, посредством действия подходящих ретинолдегидрогеназ (RDH), например, как проиллюстрировано в WO 2019/057998. Таким образом, предпочтительный способ получения ретинилацетата с использованием модифицированной клетки-хозяина, как определено в данном описании, включает стадии (1) ферментативного превращения бета-каротина в ретиналь под действием подходящих ВСО, (2) ферментативного превращения ретинола в ретинол посредством действия подходящих RDH, (3) ферментативного превращения ретинола в ретинилацетат и необязательно (4) выделения и/или очистки ретинилацетата из ферментационной среды.

Ретинол и/или ретинилацетат, полученные раскрытым в настоящем описании способом, могут быть дополнительно процессированы/конвертированы в витамин А в

условиях, известных в данной области техники. Таким образом, настоящее изобретение направлено на способ ферментативного производства витамина А с использованием модифицированной клетки-хозяина, как раскрыто в данном описании.

Таким образом, в конкретном воплощении настоящее изобретение направлено на способ получения продукта, выбранного из группы, состоящей из ретинола, ретинилацетата, витамина А и смеси, содержащей ретинол, ретинилацетат и витамин А, где указанная смесь содержит по меньшей мере около 30% ретинилацетата в пересчете на общее количество ретиноидов, причем указанный способ включает стадии:

(а) обеспечения клетки-хозяина, продуцирующей ретиноид, способной образовывать ретинилацетат,

(b) введения одной или нескольких модификаций в геном указанной клетки-хозяина, таких как модификация(и) фермента(ов), принадлежащих к классу ЕС 3.1.1, обладающих липазной/эстеразной активностью, например, заключающаяся(заключающиеся) в снижении/устранении ферментативной активности, включая, без ограничения указанным, делецию соответствующих генов, в частности, отмену активности липазы, соответствующей LIP8 из *Yarrowia*, и, необязательно, дальнейшее устранение активности ферментов, соответствующих LIP2, и/или LIP3, и/или LIP4, и/или TGL1, и/или или LIP16, и/или LIP17, и/или LIP18 из *Yarrowia*, где модифицированная клетка-хозяин все еще способна расти на триглицеридных маслах, таких как, например, растительное кукурузное масло, в качестве источника углерода;

(с) необязательно введения дополнительных модификаций, включающих экспрессию одной или нескольких копий (гетерологичных) ферментов, участвующих в продуцировании ретинола, ретинилацетата и/или витамина А, как известно специалисту в данной области,

(d) культивирования такой модифицированной клетки-хозяина в подходящих условиях, приводящих к образованию ретинола, ретинилацетата и/или витамина А, при этом модифицированную клетку-хозяин выращивают на растительном масле в качестве источника углерода; и

(e) необязательно выделения и/или дальнейшей очистки ретинола, ретинилацетата и/или витамина А из среды культивирования (ферментации).

Такой продукт, как ретинол, ретинилацетат и/или витамин А, полученные с помощью такого процесса, могут быть дополнительно использованы в рецептурах пищевых, кормовых или фармацевтических продуктов, используемых в данной области техники.

Модифицированную клетку-хозяин, как определено в настоящем описании, можно

культивировать в водной среде, дополненной соответствующими питательными веществами, в аэробных или анаэробных условиях и, как известно специалисту в данной области для различных клеток-хозяев, включая присутствие триглицеридных масел, таких как, например, растительное кукурузное масло, в качестве источника углерода. Культивирование/выращивание клетки-хозяина можно проводить в периодическом режиме, периодическом режиме с подпиткой, полунепрерывном или непрерывном режиме. В зависимости от клетки-хозяина, предпочтительно, продуцирование ретиноидов, таких как, например, витамин А и предшественники, такие как ретиналь, ретинол, ретинилацетат, может варьировать, как это известно специалисту в данной области техники. Культивирование и выделение клеток-хозяев, продуцирующих бета-каротин и ретиноиды, выбранных из *Yarrowia*, описано, например, в WO 2008/042338.

Источниками углерода, используемыми в настоящем изобретении, являются все подходящие триглицеридные масла, включая, без ограничения указанным, предварительно гидролизованные масла, содержащие свободные жирные кислоты, такие как олеиновая, пальмитиновая, стериновая или линолевая кислота, и глицерин, а именно, например, растительное масло, включая, без ограничения указанным, кукурузное масло, каноловое, сафлоровое, подсолнечное, соевое или арахисовое масло, предпочтительно кукурузное масло.

Термины «ретиноиды» или «смесь ретиноидов», используемые в данном описании, включают витамин А, предшественники и/или промежуточные соединения витамина А, такие как продукты расщепления бета-каротина, также известные как апокаротиноиды, включая, без ограничения указанным, ретиналь, ретиновую кислоту, ретинол, ретиновый метоксид, ретинилацетат, сложные эфиры жирных кислот ретинила, 4-кето-ретиноиды, 3-гидроксиретиноиды или их комбинации. Биосинтез ретиноидов описан, например, в WO 2008/042338. Клетка-хозяин, способная продуцировать ретиноиды, например, в способе ферментации, известна как «клетка-хозяин, продуцирующая ретиноиды». Гены пути витамина А и способы получения клеток-хозяев, продуцирующих ретиноиды, известны в данной области (см., например, WO 2019/058000), включая, без ограничения указанным, бета-каротиноксидазы, ретинолдегидрогеназы и/или ацетилтрансферазы. Подходящие ферменты ацетилтрансферазы (ATF), способные ацетилировать ретинол в ретинилацетат, описаны, например, в WO2019/058001. Подходящие бета-каротиноксидазы, приводящие к высокому процентному содержанию транс-ретиналя, описаны, например, в WO2019/057999. «Клетка-хозяин, продуцирующая ретинилацетат», согласно данному описанию, экспрессирует подходящие ATF, катализирующие превращение ретинола в ретинилацетат.

«Ретиниловые сложные эфиры жирных кислот», согласно данному описанию, также включают ретиниловые сложные эфиры с длинной цепью. Эти ретиниловые сложные эфиры с длинной цепью означают сложные эфиры углеводов, состоящие, по меньшей мере, из около 8, а именно, например, 9, 10, 12, 13, 15 или 20 атомов углерода и вплоть до около 26, а именно, например, 25, 22, 21 или менее атомов углерода, предпочтительно с наличием вплоть до около 6 ненасыщенных связей, а именно, например, с 0, 1, 2, 4, 5, 6 ненасыщенными связями. Ретиниловые сложные эфиры с длинной цепью включают, без ограничения указанным, линолевую кислоту, олеиновую кислоту или пальмитиновую кислоту.

«Витамин А» в контексте настоящего описания может представлять собой любую химическую форму витамина А, присутствующую в водных растворах, твердых веществах и составах, и включает ретинол, ретинилацетат и ретиниловые сложные эфиры. Он также включает ретиноевую кислоту, такую как, например, недиссоциированную, в форме свободной кислоты или диссоциированную в виде аниона.

Используемый в данном описании термин «ретиноль» известен под названием согласно IUPAC (2E,4E,6E,8E)-3,7-диметил-9-(2,6,6-триметилциклогексен-1-ил)нона-2,4,6,8-тетраеналя. Ретиноль включает как цис-, так и транс-изоформы, такие как, например, 11-цис-ретиноль, 13-цис-ретиноль, транс-ретиноль и полностью транс-ретиноль. Для целей настоящего изобретения предпочтительно образование транс-ретиноля, которое может быть обеспечено посредством использования стереоселективных бета-каротиноксидаз, таких как описано, например, в WO2019/057999.

«Каротиноиды», согласно данному описанию, включают длинные изопреноидные полиены, сопряженные с 40 атомами углерода, которые образуются в природе путем лигирования двух молекул геранилгеранилпирофосфата из 20 атомов углерода. К ним относятся, без ограничения указанным, фитоин, ликопин и каротин, такие как, например, бета-каротин, который может быть окислен в 4-кето- или 3-гидрокси-положении с образованием кантаксантина, зеаксантина или астаксантина. Биосинтез каротиноидов описан, например, в WO2006/102342. Клетки, способные продуцировать каротиноиды посредством одной или нескольких стадий ферментативного превращения, ведущих к каротиноидам, в частности, к бета-каротину, т.е. в которых соответствующие полипептиды, участвующие в продукции каротиноидов, экспрессируются и активны *in vivo*, называются в данном документе клетками-хозяевами, продуцирующими каротиноиды. Гены и способы получения клеток, продуцирующих каротиноиды, известны в данной области, см., например, WO2006/102342. В зависимости от производимого каротиноида могут быть задействованы разные гены.

Превращение (конверсия) в соответствии с настоящим изобретением определяется как специфическая ферментативная активность, т.е. каталитическая активность описанных в данном описании ферментов, включая, без ограничения указанным, ферментативную активность липаз или эстераз, в частности эндогенных ферментов, принадлежащих к классу EC 3.1.1.-, участвующих в превращении ретинола в ретиниловые сложные эфиры жирных кислот, бета-каротиноксидазы (BCO), ретинолдегидрогеназы (RDH), ацетилтрансферазы (ATF).

Что касается настоящего изобретения, понятно, что организмы, такие как, например, микроорганизмы, грибы, водоросли или растения также включают синонимы или базисимы таких видов, обладающих такими же физиологическими свойствами, как это определено в Международном кодексе номенклатуры прокариот или в Международном кодексе номенклатуры водорослей, грибов и растений (Мельбурнский кодекс). Так, например, штамм *Lachancea mirantina* является синонимом штамма *Zygosaccharomyces* sp. IFO 11066, происходящим из Японии.

Следующие примеры являются только иллюстративными и никоим образом не предназначены для ограничения объема изобретения. Содержание всех источников информации, патентных заявок, патентов и опубликованных патентных заявок, цитируемых в данной заявке, включено в настоящее описание в качестве ссылок, в частности WO2019/058000, WO2019/058001, WO2008/042338, WO2019/057999, WO2006/102342 или WO2019/057998.

Примеры

Пример 1. Общие методы и штаммы

Все основные процедуры молекулярной биологии и манипулирования ДНК, описанные в данной заявке, обычно выполняются в соответствии с руководством 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). Все приведенные примеры генетических манипуляций были выполнены на дрожжах *Yarrowia lipolytica*.

Анализ встряхивания планшета. Как правило, 800 мкл 0,075% дрожжевого экстракта, 0,25% пептона (0,25X YP) инокулировали 10 мкл свежесозревших дрожжей *Yarrowia* и покрывали 200 мкл минерального масла Drakeol 5 (Penfeco, Карнс-Сити, Пенсильвания, США) с 2% олеиновой кислоты в качестве источника углерода в минеральном масле. Клональные изоляты трансформантов выращивали в 24-луночных планшетах (Multitron, 30°C, 800 об/мин) в среде YPD с 20% минерального масла в течение 4 суток. Фракцию минерального масла удаляли из лунок встряхиваемого планшета и

анализировали с помощью ВЭЖХ на колонке с нормальной фазой с матричным фотодиодным детектором.

Трансформация ДНК. Штаммы трансформировали выращиванием в течение ночи на среде для планшетов YPD. 50 мкл клеток соскребали с планшета и трансформировали путем инкубации в 500 мкл с 1 мкг трансформирующей ДНК, обычно линейной ДНК для интеграционной трансформации, 40% PEG 3550MW, 100 мМ ацетата лития, 50 мМ дитиотреитола, 5 мМ Трис-Cl pH 8,0, 0,5 мМ EDTA в течение 60 минут при 40°C и высевали непосредственно на селективную среду или, в случае селекции по доминантному маркеру-антибиотику, клетки выращивали на жидкой среде YPD в течение 4 часов при 30°C перед посевом на селективные среды.

Молекулярная биология ДНК. Гены синтезировали с концами NheI и MluI в векторе pUC57. Как правило, гены субклонировали в вектор MB5082 'URA3' (SEQ ID NO:35) для отбора по маркеру при трансформациях *Yarrowia lipolytica*. Для чистой вставки гена путем случайного негомологичного соединения концов гена и маркера HindIII/XbaI (MB5082) рестрикционный фрагмент очищали с помощью гель-электрофореза и на колонке для очистки из геля Qiagen. Для получения штамма, продуцирующего ретинилацетат, из штамма, продуцирующего бета-каротин, этот штамм трансформировали плазмидой MB9232, см. таблицу 2, разрежали SfiI и дважды отбирали на автотрофность по HOM3 и URA3. Плазмиды MB9287 и MB9953, содержащие Cas9, и системы экспрессии направляющей РНК для нацеливания на LIP2, LIP3 и LIP8 в случае MB9287 и LIP4 в случае MB9953 были синтезированы в Genscript (Пискатауэй, Нью-Джерси, США).

Перечень плазмид. Используемые плазмиды, штаммы, нуклеотидные и аминокислотные последовательности перечислены в таблицах 1, 2, 3 и в перечне последовательностей. Как правило, все немодифицированные последовательности, упомянутые в настоящем описании, являются такими же, как учетная последовательность в базе данных для референсного штамма CLIB122 (Dujon B, et al., Nature. 2004 Jul 1;430(6995):35-44).

Таблица 1. Перечень плазмид, используемых для конструирования штаммов с целью сверхэкспрессии или делеции соответствующих генов (обозначено как «Вставка»), или для применения в способе CRISPR/Cas9 с использованием вставки в качестве драйвера gRNA вместе с указанным маркером. «LmATF1-mut» относится к клеткам *Lachancea mirantina* (LmATF1; SEQ ID NO:13 в WO2019058001), несущим замены аминокислот S480Q_G409A_V407I_H69A_I484L. Подробнее см. в тексте.

Плазмида	Вставка	Маркер
MB8388	Hh/hdv, snr52	Hyg
MB7452	нет (pre-Cas9)	Nat
MB8845	Cas9; направляющая РНК для нацеленного воздействия на lip2	Hyg
MB8699	Cas9; направляющая РНК для нацеленного воздействия на lip3	Hyg
MB9953	Cas9; направляющая РНК для нацеленного воздействия на lip4	Hyg
MB9373	Cas9; направляющая РНК для нацеленного воздействия на lip8	Hyg
MB9148	Cas9; направляющая РНК для нацеленного воздействия на lip16	Hyg
MB9149	Cas9; направляющая РНК для нацеленного воздействия на lip17	Hyg
MB9276	Cas9; направляющая РНК для нацеленного воздействия на lip18	Hyg
MB9702	Cas9; направляющая РНК для нацеленного воздействия на tgl1	Hyg
MB9282	Cas9; направляющая РНК для нацеленного воздействия на Ku	Hyg
MB9150	Cas9; направляющая РНК для нацеленного воздействия на ura3	Hyg
MB9232	LmATF1-mut	НOM3 URA3

Таблица 2. Перечень используемых штаммов *Yarrowia*. Конструкция ML7788 и ML15710 описаны в WO 2016172282 (таблица 2 и пример 5). Дополнительные сведения см. в тексте или в таблице 1

Штамм	Описание
ML17544	ML15710 с исправленными URA3 с помощью FOA и HygR с помощью Cre/lox
ML17968	ML17544, трансформированный MB8457 UmCCO1
ML18183	ML17968 трансформированный MB7452 [Cas9 NatR CEN]
ML18210	ML18183 трансформированный MB8549 Cas9 hom3
ML18210-1	ML18210 трансформированный MB9232 НOM3::LmATF1-mut::URA3
ML18210-2	ML18210-1 трансформированный MB7452 [precas9] MB9282 ku70 MB9373 lip8
ML18210-3	ML18210-2 трансформированный MB7452 [precas9] MB9282 ku70 MB9373 lip8 MB8845 lip2
ML18210-4	ML18210-3 трансформированный MB7452 [precas9] MB9282 ku70 MB9373 lip8 MB8845 lip2 MB8699 lip3
ML18210-5	ML18210-3, трансформированный MB7452 [precas9] MB9282 ku70 MB9373 lip8 MB8845 lip2 MB8699 lip3 MB9953 lip4

Таблица 3А. Список последовательностей, использованных для конструирования плазмид/штаммов. Подробнее о последовательностях см. в перечне последовательностей

Название	SEQ ID NO: (ак/нт)
lip2	1/2
lip3	3/4
lip8	5/6
tgl-1	7/8
lip16	9/10
lip17	11/12
lip18	13/14

lip4	15/16
est1	17/18
lip11	19/20
lip12	21/22
lip20	23/24
lip1	25/26
lip15	27/28
lipR	29/30
lip2	1/2

Таблица 3В. Перечень праймеров для способа CRISPR Cas9, ПЦР, секвенирования, как описано в Примере 3. Дополнительные сведения о последовательностях см. в перечнях последовательностей

Праймер	Описание	SEQ ID NO:
13304	Ku70-d-Top-66	36
13305	Ku70-d-Bot-66	37
13308	Ku70-c-Top-24	38
13309	Ku70-c-Bot-24	39
12491	ura3-Cas9-Top-66	40
12492	ura3-Cas9-Bot-66	41
12493	ura3-2-Top-24	42
12494	ura3-2-Bot-24	43
14054	lip16 pcr rev full	44
14053	lip16 pcr for full	45
14052	Lip16Dbtm	46
14051	Lip16Dtop	47
13418	LIP17-24-Bot	48
13417	LIP17-24-Top	49
13324	LIP18 rev seq	50
13323	LIP18 for seq	51
13322	LIP18 rev pcr	52
13321	LIP18 for pcr	53
13315	LIP3-Cas9-24-b-Bot	54
13314	LIP3-Cas9-24-b-Top	55
13313	LIP8-Cas9-34-Bot	56
13312	LIP8-Cas9-34-Top	57
13259	LIP18-Cas9-24-Bot	58
13258	LIP18-Cas9-24-Top	59
13257	LIP18-Cas9-66-Bot	60
13256	LIP18-Cas9-66-Top	61
13147	LIP17 rev seq	62
13146	LIP17 for seq	63
13145	LIP17 rev pcr	64
13144	LIP17 for pcr	65
13143	LIP16 rev seq	66
13142	LIP16 for seq	67
13141	LIP16 rev pcr	68
13140	LIP16 for pcr	69
13111	LIP17-Cas9-24-Bot	70
13110	LIP17-Cas9-24-Top	7
13109	LIP17-Cas9-66-Bot	72
13108	LIP17-Cas9-66-Top	73
13107	LIP16-Cas9-24-Bot	74
13106	LIP16-Cas9-24-Top	75

13105	LIP16-Cas9-66-Bot	76
13104	LIP16-Cas9-66-Top	77
12850	Lip8 rev seq	78
12849	Lip8 for seq	79
12848	Lip8 rev pcr	80
12847	Lip8 for pcr	81
12840	LIP2ioRevXba	82
12839	LIP2ioFwdMlu	83
12838	LIP2iorevMlu	84
12837	LIP2ioFwdkpn	85
12821	LIP8-Cas9-24-Bot	86
12820	LIP8-Cas9-24-Top	87
12819	LIP8-Cas9-66-Bot	88
12818	LIP8-Cas9-66-Top	89
12707	LIP2 for seq	90
12706	LIP2 rev pcr	91
12705	LIP2 for pcr	92
12602	LIP2-Cas9-24-Bot	93
12601	LIP2-Cas9-24-Top	94
12600	LIP2-Cas9-66-Bot	95
12599	LIP2-Cas9-66-Top	96
12564	LIP3 rev seq	97
12563	LIP3 for seq - (действительно обратный)	98
12562	LIP3 rev pcr	99
12561	LIP3 for pcr	100
12464	LIP3-Cas9-24-Bot	101
12463	LIP3-Cas9-24-Top	102
12462	LIP3-Cas9-66-Bot	103
12461	LIP3-Cas9-66-Top	104
14025	tglseq-rev	105
14024	tglseq-fwd	106
14023	TglDelta-rev	107
14022	TglDelta-fwd	108
13307	Ku70-e-Bot-66	109
13306	Ku70-e-Top-66	110
12074	ku70RightseqFwd	111
12073	ku70LeftseqFwd	112
14152-2	Lip4-5'-top-24	113
14152-3	Lip4-5'-bot-24	114
14152-4	Lip4-3'-top-66	115
14152-5	Lip4-3'-bot-66	116
14151	LIP4-5'seq-fwd	117
14152	LIP4-3'seq-rev	118

Условия ферментации. Ферментация была идентична ранее описанным условиям с использованием слоя минерального масла и резервуара с мешалкой в настольном реакторе с общим объемом от 0,5 до 5 л (см. WO2016/172282, Примеры 5 и 6, но с другим маслом), однако с подпиткой олеиновым маслом. Как правило, такие же результаты наблюдались с реактором с периодической подпиткой с мешалкой, но с повышенной производительностью, что продемонстрировало полезность системы для производства ретиноидов. Предпочтительно, ферментацию проводили с 6% глюкозой и добавляли 20% минерального масла после того, как содержание растворенного кислорода падало ниже

около 20%, и возобновляли подачу для достижения 20% растворенного кислорода на протяжении всей программы подпитки. Содержимое ферментеров собирали и сравнивали через 138 часов.

Способ UPLC с обращенной фазой для определения ретинола. Для быстрого скрининга этот способ не разделяет цис-изомеры, а только основные функциональные группы. Для ввода проб использовали Waters Acquity UPLC с детекцией PDA (или аналогичный) с автоматическим пробоотборником. Для разделения ретиноидов использовали Acquity UPLC HSS T3 1,8 мкм P/N 186003539. Подвижная фаза состояла из 1000 мл гексана, 30 мл изопропанола и 0,1 мл уксусной кислоты для родственных ретиноидам соединений. Температура колонки составляла 20°C, объем инъекции составлял 5 мкл. Детектор представлял собой матричный фотодиодный детектор, работающий в диапазоне от 210 до 600 нм. Аналиты детектировали в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4А. Перечень аналитов, используемых в способе с обращенной фазой для определения ретинола. Суммирование всех добавленных промежуточных соединений дает общее количество ретиноидов. Бета-каротин* может быть обнаружен при длине волны 325 нм и будет мешать количественному определению ретинилового сложного эфира, поэтому необходимо следить за пиком каротина и не включать его в количественное определение ретиноидов. «N/A» означает «недоступно». Подробнее см. в тексте

Промежуточные соединения	Время удержания [мин]	Лямбда макс [нм]	Респонсивный фактор
ретинилацетат	2,93	325	1,00
ретиниловые сложные эфиры	3,2-3,8	325	1,68
ретиаль	2,77	325	0,87
ретинол	2,73	325	0,87
Бета-каротин*	3,56	450	N/A

Таблица 4В. Градиент способа UPLC с растворителем А: вода; растворителем В: ацетонитрил; растворителем С: метанол; растворителем D: трет-бутилметилэфир

Время [мин]	%А	%В	%С	%D	Поток [мл/мин]	Давление [пси/бар]
0	50	50	0	0	0,5	9500-14000 макс
0,5	50	50	0	0	0,5	
1	0	50	50	0	0,5	
1,25	0	0	100	0	0,5	
3,25	0	0	5	95	0,5	
3,5	0	0	5	95	0,5	
4	0	0	100	0	0,5	
4,25	0	50	50	0	0,5	
4,5	50	50	0	0	0,5	

Калибровка способа. Способ откалиброван по ретинилацетату; ретинолы и ретиали количественно определены относительно ретинилацетата с использованием указанного респонсивного фактора. Ретинилацетат растворяли в THF в концентрации

~200 мкг/мл для исходного раствора с использованием мерной колбы. С помощью мерных колб готовили 20-, 50- и 100-кратные разведения исходного раствора в смеси метанол/МТВЕ 50/50. УФ-поглощение ретинилацетата довольно быстро становится нелинейным, поэтому необходимо соблюдать осторожность, чтобы оставаться в пределах линейного диапазона. Следовательно, более низкие концентрации могут быть лучше. Ретинилпальмитат также можно использовать в качестве калибровки ретинилового сложного эфира.

Приготовление образцов. Образцы готовили различными способами в зависимости от условий. Для образцов цельного бульона или промытого бульона бульон помещали в пробирку Precellys®, взвешивали и добавляли подвижную фазу. Вкратце, в пробирку Precellys® объемом 2 мл добавляли 25 мкл хорошо перемешанного бульона и 975 мкл THF. Затем образцы обрабатывали в гомогенизаторе Precellys® (Bertin Corp, Роквилл, Мэриленд, США) при максимальной настройке 3X в соответствии с указаниями производителя, обычно 3 повтора x 15 минут x 7500 об/мин. Для промытого осадка образцы центрифугировали в пробирке объемом 1,7 мл в микроцентрифуге при 10000 об/мин в течение 1 минуты, бульон декантировали, добавляли 1 мл воды, перемешивали, осаждали и декантировали и доводили до исходного объема. Смесь снова осаждали и доводили до соответствующего количества подвижной фазы и гомогенизировали с помощью прибора Precellys® (технология “bead beating”). Для анализа фракции минерального масла образец центрифугировали при 4000 об/мин в течение 10 минут, масло декантировали сверху пипеткой прямого вытеснения (Eppendorf, Хаапподж, Нью-Йорк, США) и разбавляли подвижной фазой, перемешивали на вибрационном смесителе и измеряли концентрацию ретиноидов с помощью анализа UPLC.

Пример 2. Сверхэкспрессия липазы/эстеразы в *Yarrowia lipolytica*

Чтобы проверить влияние эндогенных липаз и/или эстераз на продуцирование ретиноидов у подходящего хозяина *Yarrowia*, были проведены эксперименты со сверхэкспрессией, в которых только 1 ген на тот момент был сверхэкспрессирован (никакой комбинации 2 или более генов).

Липазы сверхэкспрессировали, как описано выше (Пример 1). Гены нативной липазы *Yarrowia* были синтезированы, и их последовательность проверена с помощью GenScript, а затем клонированы в сайты *NheI* и *MluI* в MB5082. Гены управляются промотором *TEF1*, что позволяет проводить отбор путем комплементации ауксотрофного штамма по урацилу (*ura3*).

Плазмиды, содержащие соответствующие гены липазы/эстеразы, расщепленные по *XbaI/HindIII*, трансформировали в продуцирующий ретиноид штамм ML18210-9, несущий

ген *lip8* дикого типа (см. Пример 1, таблицу 2), и отбирали на прототрофию урацила. Клональные изоляты трансформантов выращивали в течение четырех дней в среде 0,25X дрожжи/пептон (YP) с 2% кукурузным маслом в качестве источника углерода и 20% слоем минерального масла в стандартном анализе во встряхиваемом планшете и анализировали ранее описанным аналитическим способом UPLC. По меньшей мере, два отдельных клональных изолята трансформированных штаммов *Yarrowia* тестировали на встряхиваемом планшете и измеряли с помощью анализа UPLC % ретиниловых сложных эфиров и % ретинола на массу от общего количества ретиноидов. Результат представлен в таблице 5, где показано продуцирование ретиниловых сложных эфиров жирных кислот и ретинола. Наилучшая производительность по накоплению ретиниловых сложных эфиров жирных кислот и превращению ретинола достигаются при избыточной экспрессии LIP8, и некоторый незначительный эффект был замечен при избыточной экспрессии LIP3.

Таблица 5. Производительность штаммов *Yarrowia* со сверхэкспрессией отдельных эндогенных липаз или эстераз. Дано процентное содержание сложных эфиров ретинила («% сложных эфиров») и ретинола («% ретинола») в расчете на общее количество ретиноидов. Пустой вектор представляет собой плазмиду без встроенной ORF, которую можно интерпретировать как отрицательный контроль. Подробнее см. в тексте

Вставка	% Сложных эфиров	% Ретинола
Пустой вектор	8	26
LIP3	24	18
LIP8	95	3
TGL1	8	43
LIP16	7	61
LIP17	8	65
LIP18	9	45
EST1	7	25
LIP11	6	26
LIP12	6	25
LIP20	7	25
LIP1	6	26
LIP15	7	25
LIPR	7	24
IPF3594	5	25

Пример 3. Делеция генов липазы в *Yarrowia lipolytica*

Гены липазы удаляли современными способами CRISPR Cas9. Штаммы предварительно трансформировали MB7452, экспрессирующим Cas9 (SEQ ID NO:34), в условиях отбора на ноурсетрицине, что повышало частоту делеций при последующей трансформации направляющей РНК. Направляющие РНК Cas9 отбирали с использованием программного обеспечения Geneious® 10.1.3 (Biomatters Ltd). Были выбраны сайты, которые находятся как можно ближе к началу открытой рамки считывания (ORF) для одиночных разрезов или на 5' и 3' для удаления большей части

гена. Направляющие РНК встраивали в сайты клонирования SapI вектора MB8388 (SEQ ID NO:33), синтезировали и подтверждали последовательность с помощью GenScript (последовательности см. в Таблице 3). Штаммы трансформировали и отбирали на YPD-гигромицине в концентрации 200 мкг/мл, затем реплики высевали на YPD. Плазмиды пассировали путем роста на планшетах с YPD, содержащих 100 мкг/мл ноурсетрицина, и реплики высевали на YPD-гигромицин при 200 мкг/мл для выявления колоний, которые потеряли фрагмент направляющей РНК, но все еще содержат плазмиду PreCas9, MB7452. Затем эти клоны подвергали скринингу на предмет делеции с помощью ПЦР по гену с использованием праймеров, расположенных на 100 п.н. выше и на 100 п.н. ниже, идентифицируя делецию по подвижности в геле и с последующим секвенированием делеции. Для точного удаления ORF для делеций Cas9 матричную ДНК (100 п.н. с 50 п.н. 5' ORF и 50 п.н. 3' ORF, как в штамме CLIB122) использовали в штаммах, в которых ген *ku70* (YALI0C08701g) был ранее делетирован с использованием MB9282. Последовательности области экспрессии направляющей РНК указаны в Таблице 3. Нуклеотиды, которые кодируют направляющие в последовательности, отжигали и лигировали по сайтам SapI, что приводит к удалению сайта SapI, который присутствовал в олигонуклеотиде. Отжиг направляющих нацеливается специфическими выступами в направляющей последовательности (от 5' к 3' на верхней нити: ATG, GTT, CGT, TTT). Первые три нуклеотида направляющей, содержащие сайт SapI, включены в последовательность вставки для ясности при выравнивании, и отожденные выступы могут быть собраны в вектор MB8388 (SEQ ID NO:33) путем сопоставления выступов. Вставки из 24 пар оснований вставляются в направляющую РНК, которая управляется и процессируется системой рибозимов в виде головки молотка (hh, hdv), а вставка из 66 пар оснований управляется промотором SNR52 из *Yarrowia*. Одноцепочечные олигонуклеотиды могут собирать направляющие последовательности путем отжига верхних и нижних наборов и использования их для лигирования в соответствующие сайты SapI. Плазмиды, содержащие эти вставки в MB8388, были обычным образом синтезированы у поставщика ДНК GenScript (Пискатауэй, Нью-Джерси, США). Примеры олигонуклеотидов, используемых в этих сборках, включены в таблицу 3В.

Пример 4. Влияние нокаутов липазы на образование ретинилацетата

Чтобы изучить влияние на продукцию ретинилацетата, мы сконструировали делеции липазы в штамме-производителе ретинилацетата ML18210-1, экспрессирующем высокоактивную ацетилтрансферазу, полученную из *Lachancea mirantina*, т.е. LmATF1 (см. WO2019058001: SEQ ID NO:13), несущем аминокислотные замены S480Q_G409A_V407I_H69A_I484L. Происхождение указанного штамма известно из таблицы 2. Удаление

открытых рамок считывания генов липазы проводили с помощью способов CRISPR Cas9. Эта схема была реализована путем первичного введения мутации ku70 с использованием MB9282 и последующей котрансформации плазмид с делецией липазы с ДНК-матрицей (100 пар нуклеотидных оснований 5' и 3' ORF, упорядоченных как FragmentGENE из Genewiz.com, Кембридж, Массачусетс, США), который направляет точную делецию ORF, поскольку для репарации двухцепочечного разрыва у мутанта ku70 требуется гомологичная рекомбинация. С помощью этой метода проводили делецию только одного или нескольких генов липазы, т.е. серийную делецию. Указанные модифицированные штаммы тестировали на образование ретиноидов, в частности на образование ретинилацетата, как показано в таблице 6, с акцентом на чистоту, т.е. процентное содержание ретинилацетата в расчете на общее количество ретиноидов, и относительное содержание, т.е. сравнение между образованием ретинилацетата в штамме с делецией липазы и образованием ретинилацетата в штамме ML18210-1 (штамм дикого типа для всех эндогенных генов липазы). Штаммы выращивали в 2% олеиновой кислоте в 0,25-кратном количестве дрожжевого пептона, во встряхиваемых планшетах с подпиткой, и ферментировали с верхним слоем 20% минерального масла в течение четырех дней при 30°C во встряхиваемых планшетах, как описано в Примере 1. Результаты показаны в Таблице 6 для делеции только LIP8, что приводит к 70% ретинилацетата в расчете на общее количество ретиноидов, или в комбинации с LIP2, и/или LIP3, и/или LIP4, с некоторым дальнейшим увеличением процента. Добавление дополнительных делеций, выбранных из TGL1, и/или LIP16, и/или LIP17, и/или LIP18, может привести, по меньшей мере, к такому же процентному содержанию ретинилацетата, т.е. дальнейшее увеличение по меньшей мере на около 10% по сравнению с образованием ретинилацетата в штамме только с делецией LIP8.

Таблица 6. Влияние делеций липазы на чистоту и количество образования ретинилацетата у ретинилацетат-продуцирующего хозяина *Yarrowia*. «%retAc» означает чистоту ретинилацетата, «увеличение [%]» означает содержание ретинилацетата относительно значения для штамма ML18210-2, принятого за ноль, «делеция» относится к удаленным генам. Для получения более подробной информации, см. текст

Штамм ML	Делеция	%retAc	Увеличение [%]
18210-1	N/A	N/A	N/A
18210-2	lip8	70%	0
18210-3	lip8 lip2	78%	12
18210-4	lip8 lip2 lip3	92%	31
18210-5	lip8 lip2 lip3 lip4	94%	32

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Клетка-хозяин, продуцирующая ретиноиды, способная к образованию ретинилацетата, в частности, клетка-хозяин, продуцирующая ретинилацетат, такая как грибная клетка-хозяин, предпочтительно клетка масляных дрожжей, такая как, например, *Yarrowia*, включающая одну или несколько генетических модификаций, таких как снижение или устранение, предпочтительно устранение, эндогенных ферментов, участвующих в предварительном расщеплении растительного масла до глицерола и жирных кислот, предпочтительно эндогенных ферментов, принадлежащих к классу ЕС 3.1.1., более предпочтительно ферментов с эстеразной или липазной активностью.

2. Клетка-хозяин по п. 1, отличающаяся тем, что экспрессия эндогенных генов снижена или устранена, предпочтительно устранена, причем указанные гены кодируют ферменты с активностью, соответствующей активности ферментов, выбранных из группы, состоящей из LIP2, LIP3, LIP4, LIP8, TGL1, LIP16, LIP17, LIP18 *Yarrowia* и их комбинаций.

3. Клетка-хозяин по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что модификация приводит к увеличению процентного содержания ретинилацетата по меньшей мере до около 70%, например, по меньшей мере до около 70-90% в расчете на общее количество ретиноидов по сравнению с клеткой-хозяином, в которой соответствующие гены все еще экспрессируются и активны.

4. Клетка-хозяин по любому из пп. 1-3, содержащая модификацию полипептида, полученного из *Yarrowia lipolytica*, идентичного по меньшей мере на около 50%, например, 60, 70, 80, 90, 95, 98 или 100%, полипептиду, выбранному из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 и их комбинаций.

5. Клетка-хозяин по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что эндогенный фермент, соответствующий LIP8 *Yarrowia*, снижен или устранен, предпочтительно устранен.

6. Клетка-хозяин по любому из пп. 1-5, отличающаяся тем, что образование ретинилацетата увеличивается во время ферментации по сравнению с образованием ретинилацетата с использованием соответствующей немодифицированной клетки-хозяина, и где процентное содержание составляет по меньшей мере около 70%, а именно, например, около 75, 80, 85, 90, 95, 98% или более, включая 100%, ретинилацетата в пересчете на общее количество ретиноидов, присутствующих в или продуцируемых указанной модифицированной клеткой-хозяином.

7. Клетка-хозяин по любому из пп. 1-6, используемая в процессе ферментации для получения ретиноидов с применением растительного масла в качестве источника

углерода, отличающаяся тем, что процентное содержание ретинилацетата, присутствующего в указанной смеси ретиноидов, составляет около 70% или более, предпочтительно около 75, 80, 85, 90, 95, 98% или более, включая 100%, ретинилацетата в пересчете на общее количество ретиноидов, присутствующих в или продуцируемых указанной клеткой-хозяином.

8. Клетка-хозяин по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что клетка-хозяин выбрана из *Yarrowia*, предпочтительно *Yarrowia lipolytica*, и включает инактивацию, предпочтительно делецию, гена LIP8, необязательно в сочетании с инактивацией, предпочтительно делецией, гена, выбранного из группы, состоящей из LIP2, LIP3, LIP4, TGL, LIP16, LIP17, LIP18 и их комбинаций.

9. Применение клетки-хозяина по любому из пп. 1-8 в способе получения ретиноидов, выбранных из группы, состоящей из ретинола, ретинилацетата, ретиниловых сложных эфиров жирных кислот, витамина А или их смесей.

10. Применение по п. 9, отличающееся тем, что процентное содержание ретинилацетата составляет около 70% или более в пересчете на общее количество ретиноидов.

11. Применение по п. 9 или 10, отличающееся тем, что клетку-хозяина выращивают на растительном масле в качестве источника углерода, предпочтительно на кукурузном масле.

12. Способ снижения или устранения процентного содержания ретиноидов, отличных от ретинилацетата, в смеси ретиноидов, полученной в процессе ферментации, включающий стадии:

(1) введения в клетку-хозяин, продуцирующую ретиноиды, гетерологичных генов, кодирующих ферменты, участвующие в превращении ретинола в ретинилацетат, и, необязательно, ферментов, участвующих в превращении ретиналя в ретинол и/или в превращении бета-каротина в ретиналь,

(2) введения одной или нескольких модификаций в активность эндогенных ферментов, участвующих в предварительном расщеплении растительного масла до глицерола и жирных кислот, предпочтительно ферментов, принадлежащих к классу EC 3.1.1., более предпочтительно ферментов, обладающих липазной или эстеразной активностью, наиболее предпочтительно с активностями, соответствующими LIP8, LIP2, LIP3, LIP4, TGL, LIP16, LIP17, LIP18 *Yarrowia* и их комбинациям, где модификация представляет собой снижение или устранение такой ферментативной активности, предпочтительно устранение указанной ферментативной активности.

13. Способ получения продукта, выбранного из группы, состоящей из ретинола,

ретилацетата, витамина А и смеси, содержащей ретинол, ретилацетат и витамин А, причем указанный способ включает стадии:

(а) обеспечения клетки-хозяина, продуцирующей ретиноиды, способной образовывать ретилацетат,

(b) введения одной или нескольких модификаций в геном указанной клетки-хозяина, таких как модификация(и) в ферменте(ах), принадлежащем(их) к классу ЕС 3.1.1., обладающем(их) липазной активностью, а именно, например, снижение/устранение ферментативной активности, включая, без ограничения указанным, делецию соответствующих генов, в частности, устранение активности липазы, соответствующей LIP8 Yagowia, и, необязательно, дальнейшее устранение ферментативной активности, соответствующей LIP2, и/или LIP3, и/или LIP4, и/или TGL, и/или LIP16, и/или LIP17, и/или LIP18 Yagowia, где модифицированная клетка-хозяин все еще способна расти на растительном масле в качестве источника углерода;

(с) необязательно введения дополнительных модификаций, включающих экспрессию одной или нескольких копий (гетерологичных) ферментов, участвующих в продуцировании ретинола, ретилацетата и/или витамина А, как известно специалисту в данной области,

(d) культивирования такой модифицированной клетки-хозяина в подходящих условиях, приводящих к образованию ретинола, ретилацетата и/или витамина А, при этом модифицированную клетку-хозяина выращивают на растительном масле в качестве источника углерода; и

(е) необязательно выделения и/или дальнейшей очистки ретинола, ретилацетата и/или витамина А из среды культивирования (ферментации).

14. Способ идентификации подходящих эндогенных гидролаз, подлежащих модификации для увеличения процентного содержания ретилацетата при культивировании клетки-хозяина, продуцирующей ретилацетат, выращиваемой на растительном масле в качестве источника углерода, включающий стадии:(1) отбора эндогенных ферментов липазы или эстеразы на основе гомологии последовательностей по меньшей мере на около 50%, а именно, например, 60, 70, 80, 90, 95, 98 или 100% с SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15,

(2) сверхэкспрессии выбранных генов и сравнения процентного содержания ретилацетата в пересчете на общее количество ретиноидов,

(3) отбора генов, сверхэкспрессия которых отрицательно влияла на процентное содержание ретилацетата в смеси ретиноидов, и

(4) снижения или устранения, т.е. инактивации, а именно, например, путем делеции

выбранных генов для усиления образования ретиниловой кислоты в смеси ретиноидов.