

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges
Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum
7. April 2016 (07.04.2016)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2016/050656 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

C12P 17/06 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2015/072189

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. September 2015 (27.09.2015)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
14187583.1 3. Oktober 2014 (03.10.2014) EP

(71) Anmelder: SYMRISE AG [DE/DE]; Mühlenfeldstraße 1,
37603 Holzminden (DE).

(72) Erfinder: WESSJOHANN, Ludger; Otto-Kannig Straße
32, 06120 Halle (Saale) (DE). BAUER, Anne-Kathrin;
Ahornweg 33b, 06132 Halle (Saale) (DE). LEY, Jakob;
Schubertstraße 5a, 37603 Holzminden (DE). GEISLER,
Thorsten; Tiedexer Tor 2, 37574 Einbeck (DE).

GEISLER, Katrin; Tiedexer Tor 2, 37574 Einbeck
(DE).

(74) Anwalt: FABRY, Bernd; IP2 Patentanwalts GmbH,
Schlossstraße 523-525, Mönchengladbach 41238 (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR THE BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF FLAVONOIDS

(54) Bezeichnung : VERFAHREN ZUR BIOTECHNOLOGISCHEN HERSTELLUNG VON FLAVONOIDEN

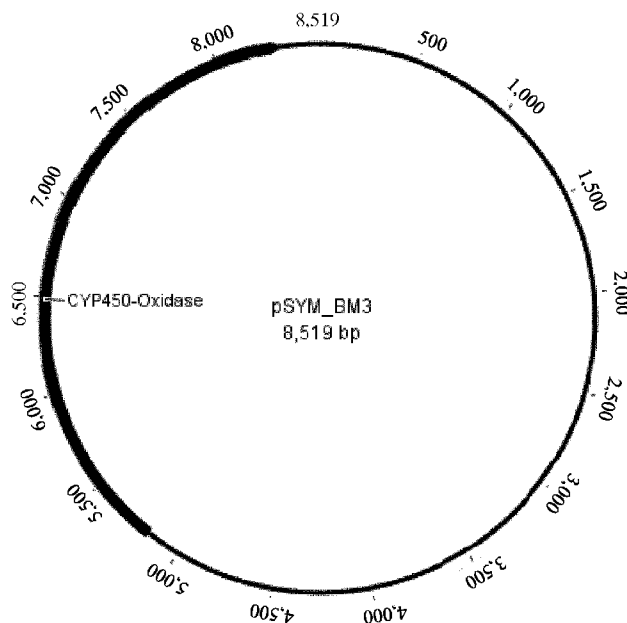


Abbildung 1
Plasmid pSYM_BM3 mit CYP450-Oxidase-Gen
AA

AA plasmid pSYM_BM3 with a CYP450 oxidase gene

(57) Abstract: A method is proposed for producing flavonoids, comprising the steps: (a) providing of a transgenic microorganism, containing (i) a first nucleic acid section (A), comprising or consisting of a gene coding for a CYP450 oxidase, (ii) a second nucleic acid section (B), comprising or consisting of a gene coding for a plant O-methyltransferase, and (b) adding of one or more flavanones to the transgenic microorganism, (c) the conversion of the substrate flavanones by the transgenic microorganism to the corresponding flavonoids, and optionally (d) isolating and purifying of the final products.

(57) Zusammenfassung: Vorgeschlagen wird ein Verfahren zur Herstellung von Flavonoiden, umfassend die Schritte: (a) Bereitstellen eines transgenen Mikroorganismus, enthaltend (i) einen ersten Nukleinsäure-Abschnitt (A), umfassend oder bestehend aus einem für eine CYP450-Oxidase kodierenden Gen, (ii) einen zweiten Nukleinsäure-Abschnitt (B), umfassend oder bestehend aus einem für eine pflanzliche O-Methyltransferase kodierenden Gen, sowie (b) Hinzufügen eines oder mehrerer Flavanone zu dem transgenen Mikroorganismus, (c) die Umsetzung der Substrat Flavanone durch des transgenen Mikroorganismus zu den entsprechenden Flavonoiden, sowie gegebenenfalls (d) Isolierung und Aufreinigung der Endprodukte.

WO 2016/050656 A1



KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)

5 **VERFAHREN ZUR BIOTECHNOLOGISCHEN HERSTELLUNG VON FLAVONOIDEN**

GEBIET DER ERFINDUNG

10 **[0001]** Die Erfindung befindet sich auf dem Gebiet der Biotechnologie und betrifft ein Verfahren, bei dem man Flavanone ohne chemische Zwischenschritte in die entsprechenden Flavonoide umwandelt, einen entsprechenden Mikroorganismus, einen Vektor und eine Wirtszelle.

15 **STAND DER TECHNIK**

[0002] Flavonoide wie beispielsweise Homoeriodictyol, Eriodictyol (**EP 1258200 B1**) und Hesperetin (**EP 1998636 B1**) stellen wichtige Geschmacks- und Aromastoffe dar. Üblicherweise werden diese Stoffe durch Aldolreaktion von freiem oder partiell methylierten Acetophloroglucinol mit freiem oder partiell methylierten Protocatechualdehyd erzeugt.

20 Obwohl die Verfahren inzwischen industriell etabliert sind, weisen sie entscheidende Nachteile auf: so besteht die Notwendigkeit, die phenolischen Funktionen während des Reaktionsverlaufes mit Schutzgruppen zu versehen, die später wieder entfernt werden müssen. Dadurch werden die Synthesen vielstufig, d.h. technisch aufwendig und im Ergebnis natürlich auch kostspielig.

25 **[0003]** Gegenstand der **WO 2005 115377 A1** ist eine Nahrungsmittelzusammensetzung umfassend Flavonoide und Tocotrienol, worin die Flavonoide Naringenin, Hesperetin, Nobiletin oder Tangeretin darstellen können.

[0004] Besonders nachteilig ist indes, dass es sich hierbei um chemische Herstellverfahren handelt, d.h. aus regulatorischen Gründen dürfen die damit hergestellten Lebensmittel-

30 zusatzstoffe, Geschmacksstoffe und Aromen nicht als natürlich bezeichnet werden. Die Kennzeichnung als natürlich oder naturidentisch ist indes für viele Verbraucher für ausschlaggebend für eine Kaufentscheidung, es liegt daher auf der Hand, dass ein besonderer Bedarf an entsprechenden Flavonoiden besteht, die diese Kennzeichnung tragen dürfen.

35 **[0005]** Ein Ausweg könnte die Gewinnung der Flavonoiden aus pflanzlichen Rohstoffen sein, beispielsweise durch Extraktion aus *Eriodictyon spp.* Diese Prozesse sind jedoch zeit- und kostenaufwändig, beruhen zum Teil auf Wildsammlungen der Pflanzen, sind saisonabhängig, Lösungsmittel- und Prozess-intensiv und daher ebenfalls für eine breite kommerzielle Nutzung ungeeignet.

[0006] Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung hat somit darin bestanden, ein Verfahren zur Herstellung von Flavonoiden, insbesondere von Eriodictyol, Hesperetin, Sterubin und/oder Homoeriodictyol zur Verfügung zu stellen, das frei von den eingangs geschilderten Nachteilen ist. Ein besonderes Augenmerk sollte darauf liegen, dass die Flavonoide in kurzen Reaktionszeiten und in hohen Ausbeuten zur Verfügung gestellt werden können, wobei das Verfahren frei von chemischen Reaktionsschritten sein sollte, damit die Reaktionsprodukte anschließend als natürlich oder naturidentisch bezeichnet werden können.

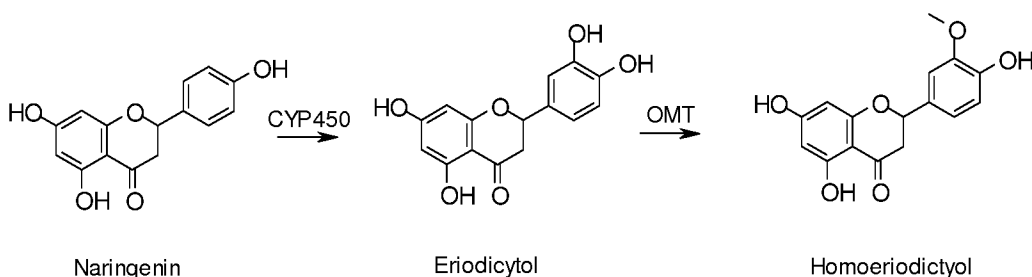
BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0007] Ein erster Gegenstand der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Flavonoiden, umfassend die Schritte:

- (a) Bereitstellen eines transgenen Mikroorganismus, enthaltend
 - (i) einen ersten Nukleinsäure-Abschnitt (A), umfassend oder bestehend aus einem für eine CYP450-Oxidase kodierenden Gen,
 - (ii) einen zweiten Nukleinsäure-Abschnitt (B), umfassend oder bestehend aus einem für eine pflanzliche O-Methyltransferase kodierenden Gen, sowie
- (b) Hinzufügen eines oder mehrerer Flavanone zu dem transgenen Mikroorganismus,
- (c) die Umsetzung der Substrat Flavanone durch des transgenen Mikroorganismus zu den entsprechenden Flavonoiden, sowie gegebenenfalls
- d) Isolierung und Aufreinigung der Endprodukte.

[0008] Überraschenderweise wurde gefunden, dass durch Einbau von zwei unterschiedlichen Nukleinsäure-Abschnitten, die einmal ein für eine bakterielle CYP450 Oxidase und zum anderen ein für eine pflanzliche O-Methyltransferase kodierendes Gen enthalten in einen geeigneten Mikroorganismus, vorzugsweise einen fakultativ anaeroben Mikroorganismus ein System zur Verfügung steht, welches bei Zugabe von Flavanonen und Kultivierung die Umsetzung zum Flavonoid in kurzen Zeiten und ausgezeichneten Ausbeuten möglich macht.

[0009] Das Verfahren wird anhand des Beispiels Homoeriodictyol aus Naringenin in dem folgenden Schema verdeutlicht:



[0010] Im Stand der Technik war bekannt, dass Naringenin durch transgene Mikroorganismen wie z.B. *Sacharomyces cerevisiae*, welche eine Flavonoid-3'-hydroxylase aus *Gerbera hybrid* oder eine CYP450-Oxidase aus *Phanerochaete chrysosporium* bilden¹, in Eriodictyol umgewandelt werden kann (Kasai, N. *et al.* Enzymatic properties of cytochrome P450 catalyzing 3'-hydroxylation of naringenin from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **387**, 103–8 (2009)). Jedoch erfolgte hier

die Umwandlung nur bis zum Eriodictyol, eine direkte Weiterreaktion zum Homoeriodictyol konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

[0011] Weitere Verfahren zur Herstellung von Eriodictyol aus Naringenin sind in Kitamura, E. et al. „*Production of Hydroxylated Flavonoids with Cytochrome P450 BM3 Variant F88V and Their Antioxidative Activities*” [Biosci. Biotechnol. Biochem. **77**, 1340–1343 (2013)] und Kabumoto, H., Miyazaki, K. & Arisawa, “*A Directed Evolution of the Actinomycete Cytochrome P450 MoxA (CYP105) for Enhanced Activity*” [Biosci. Biotechnol. Biochem. **73**, 1922–1927 (2009)] veröffentlicht. Weiterhin sind hierunter keine (biotechnologischen) Verfahren zur Herstellung von Eriodictyol und/oder Homoeriodictyol im Sinne der vorliegenden Erfindung zu verstehen, insbesondere kein Verfahren (wie oben beschrieben), das sich zur industriellen Herstellung von Eriodictyol und/oder Homoeriodictyol eignet, da die Ausbeuten als sehr gering einzuschätzen sind (z.B. 5,2 % in Kitamura et al.).

[0012] Aus J. Microbiol. Biotech. **16(7)**, s.1090-1096 (2006) ist zudem die Methylierung von Flavonoiden unter Verwendung des Enzyms O-Methyltransferase aus *Bacillus cereus* bekannt, wobei Homoeriodictyol aus Eriodictyol gebildet wird.

[0013] Im Rahmen der Untersuchungen im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung konnten für die Zwecke des hierin beschriebenen Verfahrens entscheidende molekularbiologische und biochemische Grundlagen der Biotransformation – mit dem Ziel der Produktion von Eriodictyol und/oder Homoeriodictyol in industriellem Maßstab – aufgeklärt und charakterisiert werden.

[0014] Im Stand der Technik sind zwar unterschiedliche Enzymsysteme zur Bildung von Eriodictyol ausgehend von Kaffeesäure beschrieben (Leonard, E., Yan, Y. & Koffas, M. A. G. „*Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in Escherichia coli*” [Metab. Eng. **8**, 172–81 (2006)]). Allerdings gehen diese stets vom in Pflanzen beschriebenen Biosyntheseweg für Flavonoide aus und wobei Naringenin nur als Zwischenprodukt gebildet wird. Weiterhin werden hier ausschließlich pflanzliche Enzyme genutzt. Eine Synthesemethode zur Bildung von Homoeriodictyol oder Hesperetin ausgehend von Naringenin ist noch nicht bekannt.

[0015] In den beiden internationalen Patentanmeldungen WO 2006 010117 A1 (KOFFAS) und WO 2005 084305 A1 (SCHMIDT-DANNERT) ist die Anwendung heterologer Expression zur Bildung von Flavonoiden beschrieben. Darin werden (ausschließlich) pflanzliche Gene beschrieben, die für eine heterologe Expression verschiedener Substanzen (ausgehend von L-Phenylalanin, Tyrosin und Zimtsäure) genutzt werden.

[0016] Überraschenderweise wurde in der vorliegenden Erfindung eine Variante der CYP450-Oxidase aus *Bacillus megaterium* identifiziert, die durch heterologe Expression produziert werden konnte und Naringenin regioselektiv an der 3' bzw. 5'-Position hydroxyliert. Durch die zusätzliche Expression einer O-Methyltransferase gelingt es vorteilhafterweise, dass das intermediär gebildete Eriodictyol zum Homoeriodictyol umgewandelt wird.

[0017] CYP450 OXIDASEN

[0018] Eine „CYP450-Oxidase“ (CYP450) im Sinne der vorliegenden Erfindung ist ein Enzym, das die Reaktion „Flavanon $\rightleftharpoons$ 3'-Hydroxyflavanon“ katalysiert. Insbesondere katalysiert die CYP450 die Reaktion von Naringenin zu Eriodictyol (vgl. das eingangs gezeigte Reaktionsschema). Besonders bevorzugt sind CYP450-Oxidasen aus dem grampositiven Bakterium *Bacillus megaterium*.

[0019] Ausdrücklich bevorzugt ist daher ein Verfahren, bei dem das für eine bakterielle CYP450 Oxidase kodierende Gen für eine Oxidase aus dem Mikroorganismus *Bacillus megaterium* kodiert.

[0020] Eine besondere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft demnach ein Verfahren, welches sich dadurch auszeichnet, dass der in den transgenen Mikroorganismus eingebrachte Nukleinsäure-Abschnitt (A)

(i-i) eine Nukleotidsequenz gemäß **SEQ ID NO:1** (Nukleotidsequenz der für die A75G/F88V/L189Q/R472C Variante der bakterielle CYP450 aus *B. megaterium* ATCC 14581 kodierenden Gens) und/oder

(i-ii) eine Nukleotidsequenz **SEQ ID NO:2** (Nukleotidsequenz der für die A75G/F88V/L189Q/A331S/R472C Variante der bakterielle CYP450 aus *B. megaterium* ATCC 14581 kodierenden Gens) und/oder

(i-iii) eine ähnliche Nukleotidsequenz mit einer Nukleotidsequenz-Identität von 40 % oder mehr zu **SEQ ID NO:1** und/oder **SEQ ID NO:2**, vorzugsweise von 50 % oder mehr, 60 % oder mehr oder 80 % oder mehr, besonders bevorzugt von 95 % oder mehr,

umfasst oder daraus besteht.

[0021] *Mutatis mutandis* ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung ein Verfahren, bei dem die vorzugsweise bakterielle CYP450 Oxidase

(i-i) eine Nukleotidsequenz gemäß **SEQ ID NO:1** (Nukleotidsequenz der für die A75G/F88V/L189Q/R472C Variante der bakterielle CYP450 aus *B. megaterium* ATCC 14581 kodierenden Gens) und/oder

(i-ii) eine Nukleotidsequenz **SEQ ID NO:2** (Nukleotidsequenz der für die A75G/F88V/L189Q/A331S/R472C Variante der bakterielle CYP450 aus *B. megaterium* ATCC 14581 kodierenden Gens) und/oder

(i-iii) eine ähnliche Nukleotidsequenz mit einer Nukleotidsequenz-Identität von 40 % oder mehr zu **SEQ ID NO:1** und/oder **SEQ ID NO:2**, vorzugsweise von 50 % oder mehr, 60 % oder mehr oder 80 % oder mehr, besonders bevorzugt von 95 % oder mehr,

enthält.

[0022] Eine weitere besondere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft demnach ein Verfahren, welches sich dadurch auszeichnet, dass der in den transgenen Mikroorganismus eingebrachte Aminosäure-Abschnitt (A)

(i-i) eine Aminosäuresequenz gemäß **SEQ ID NO:6** (Aminosäuresequenz der für die A75G/F88V/L189Q/R472C Variante der bakterielle CYP450 aus *B. megaterium* ATCC 14581 kodierenden Gens) und/oder

(i-ii) eine Aminosäuresequenz **SEQ ID NO:7** (Aminosäuresequenz der für die A75G/F88V/L189Q/A331S/R472C Variante der bakterielle CYP450 aus *B. megaterium* ATCC 14581 kodierenden Gens) und/oder

(i-iii) eine ähnliche Aminosäuresequenz mit einer Aminosäuresequenz-Identität von 40 % oder mehr zu **SEQ ID NO:6** und/oder **SEQ ID NO:7**, vorzugsweise von 50 % oder mehr, 60 % oder mehr oder 80 % oder mehr, besonders bevorzugt von 95 % oder mehr,

umfasst oder daraus besteht.

[0023] *Mutatis mutandis* ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung ein Verfahren, bei dem die vorzugsweise bakterielle CYP450 Oxidase

(i-i) eine Aminosäuresequenz gemäß **SEQ ID NO:6** (Aminosäuresequenz der für die A75G/F88V/L189Q/R472C Variante der bakterielle CYP450 aus *B. megaterium* ATCC 14581 kodierenden Gens) und/oder

(i-ii) eine Aminosäuresequenz **SEQ ID NO:7** (Aminosäuresequenz der für die A75G/F88V/L189Q/A331S/R472C Variante der bakterielle CYP450 aus *B. megaterium* ATCC 14581 kodierenden Gens) und/oder

(i-iii) eine ähnliche Aminosäuresequenz mit einer Aminosäuresequenz-Identität von 40 % oder mehr zu **SEQ ID NO:6** und/oder **SEQ ID NO:7**, vorzugsweise von 50 % oder mehr, 60 % oder mehr oder 80 % oder mehr, besonders bevorzugt von 95 % oder mehr,

[0024] enthält. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist die „Nukleinsäure- und/oder Aminosäuresequenz-Identität“ bevorzugt anhand des Waterman-Smith-Algorithmus mit einer Lückeneröffnungs-Strafe („gap open penalty“) von 10, einer Lückenvergrößerungsstrafe („gap extension penalty“) von 0,5 und der BLOSUM62-Matrix zu bestimmen (bezüglich des Waterman-Smith-Algorithmus siehe beispielsweise *Smith, T.F. and Waterman, M.S.*, „Identification of common molecular subsequences“, *Journal of Molecular biology* (1981), 147:195-197; online implementiert über die entsprechende Werkzeugseite des EMBL). Die vorgelegten Nukleotid-Sequenzen wurden mit Hilfe der Software BISSAP des Europäischen Patentamtes gemäß WIPO Standard 25 erzeugt.

[0025] O-METHYLTRANSFERASEN

[0026] Eine „O-Methyltransferase“ (OMT) im Sinne der vorliegenden Erfindung ist ein Enzym, das die regiospezifische Methylierung bestimmter Verbindungen katalysiert, insbesondere die Reaktion von Eriodictyol zu Hesperetin, Sterubin und/oder Homoeriodictyol (vgl. das eingangs gezeigte Reaktionsschema). Besonders bevorzugt sind kationunabhängige O-Methyltransferasen aus *Mesembryanthemum crystallinum* oder *Arabidopsis thaliana*.

[0027] Ausdrücklich bevorzugt ist daher ein Verfahren, bei dem das für eine pflanzliche O-Methyltransferase kodierende Gen für eine O-Methyltransferase aus der Pflanzengattung *Mesembryanthemum* kodiert.

[0028] In Summe bevorzugt sind bestimmte Kombinationen aus CYP450 Oxidasen und O-Methyltransferasen, nämlich solchen die zum einen aus dem Bakterium *Bacillus megaterium* und zum anderen aus den Pflanzen der Spezies *Mesembryanthemum crystallinum* oder *Arabidopsis thaliana* gewonnen werden.

Eine weitere besondere Ausführungsform der Erfindung betrifft daher ein Verfahren welches sich dadurch auszeichnet, dass der in den transgenen Mikroorganismus eingebrachte Nukleinsäure-Abschnitt (B)

- 5 (ii-i) eine Nukleotidsequenz gemäß **SEQ ID NO:3** (Nukleotidsequenz der OMT aus *M. crystallinum* (McPFOMT)), und/oder
- (ii-ii) eine Nukleotidsequenz gemäß **SEQ ID NO:4** (Nukleotidsequenz der O-Methyltransferase 1 (OMT1)) und/oder
- (ii-iii) eine Nukleotidsequenz gemäß **SEQ ID NO:5** (Nukleotidsequenz der O-Methyltransferase (AOMT)) und/oder
- 10 (ii-iv) eine weitere Nukleotidsequenz mit einer Nukleotidsequenz-Identität von 40 % oder mehr zu **SEQ ID NO:3**, **SEQ ID NO:4** und/oder **SEQ ID NO:5**, vorzugsweise von 50 % oder mehr, 60 % oder mehr oder 80 % oder mehr, besonders bevorzugt von 95 % oder mehr,

umfasst oder daraus besteht.

- 15 **[0029]** *Mutatis-mutandis* ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung ein Verfahren, bei dem die O-Methyltransferase

- (ii-i) eine Nukleotidsequenz gemäß **SEQ ID NO:3** (Nukleotidsequenz der OMT aus *M. crystallinum* (McPFOMT)), und/oder
- 20 (ii-ii) eine Nukleotidsequenz gemäß **SEQ ID NO:4** (Nukleotidsequenz der O-Methyltransferase 1 (OMT1)) und/oder
- (ii-iii) eine Nukleotidsequenz gemäß **SEQ ID NO:5** (Nukleotidsequenz der O-Methyltransferase (AOMT)) und/oder
- 25 (ii-vii) eine weitere Nukleotidsequenz mit einer Nukleotidsequenz-Identität von 40 % oder mehr zu **SEQ ID NO:3**, **SEQ ID NO:4** und/oder **SEQ ID NO:5**, vorzugsweise von 50 % oder mehr, 60 % oder mehr oder 80 % oder mehr, besonders bevorzugt von 95 % oder mehr,

enthält.

- 30 Eine weitere besondere Ausführungsform der Erfindung betrifft daher ein Verfahren welches sich dadurch auszeichnet, dass der in den transgenen Mikroorganismus eingebrachte Aminosäure-Abschnitt (B)

- (ii-i) eine Aminosäuresequenz gemäß **SEQ ID NO:8** (Aminosäuresequenz der OMT aus *M. crystallinum* (McPFOMT)), und/oder
- 35 (ii-ii) eine Aminosäuresequenz gemäß **SEQ ID NO:9** (Aminosäuresequenz der O-Methyltransferase 1 (OMT1)) und/oder
- (ii-iii) eine Aminosäuresequenz gemäß **SEQ ID NO:10** (Aminosäuresequenz der O-Methyltransferase (AOMT)) und/oder
- (ii-iv) eine weitere Aminosäuresequenz mit einer Aminosäuresequenz-Identität von 40 % oder mehr zu **SEQ ID NO:8**, **SEQ ID NO:8** und/oder **SEQ ID NO:10**, vorzugsweise von

50 % oder mehr, 60 % oder mehr oder 80 % oder mehr, besonders bevorzugt von 95 % oder mehr,

umfasst oder daraus besteht.

[0030] *Mutatis-mutandis* ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung ein Verfahren, bei dem die O-Methyltransferase

(ii-i) eine Aminosäuresequenz gemäß **SEQ ID NO:8** (Aminosäuresequenz der OMT aus *M. crystallinum* (McPFOMT)), und/oder

(ii-ii) eine Aminosäuresequenz gemäß **SEQ ID NO:9** (Aminosäuresequenz der O-Methyltransferase 1 (OMT1)) und/oder

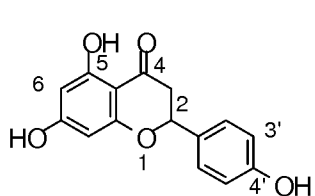
(ii-iii) eine Aminosäuresequenz gemäß **SEQ ID NO:10** (Aminosäuresequenz der O-Methyltransferase (AOMT)) und/oder

(ii-vii) eine weitere Aminosäuresequenz mit einer Aminosäuresequenz-Identität von 40 % oder mehr zu **SEQ ID NO:8**, **SEQ ID NO:9** und/oder **SEQ ID NO:10**, vorzugsweise von 50 % oder mehr, 60 % oder mehr oder 80 % oder mehr, besonders bevorzugt von 95 % oder mehr,

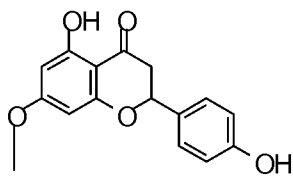
[0031] enthält **FLAVANONE**

[0032] Das bzw. ein, mehrere oder sämtliche der erfindungsgemäß zu verwendenden Flavanone bzw. Vorstufen oder Derivate davon sind vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: Naringenin, Naringin, Narirutin, oder andere natürlich vorkommenden oder künstlich hergestellten Naringeninglycoside, Sakuranetin, Sakuranetinglycoside, Isosakuranetin, Isosakuranetinglycoside, 4',7-Dihydroxy-flavanon oder dessen Glycoside, 4',7-Dihydroxy-3'-methoxy-flavanon oder dessen Glycoside, 3',7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavanon oder dessen Glycoside, 3',4',7-Trihydroxy-flavanon oder dessen Glycoside, wobei die Flavanone bezüglich der 2-Position des Flavanongerüsts als (S)-, als (R)-Enantiomer, als Racemat oder als beliebige Mischung der beiden Enantiomere vorliegen können.

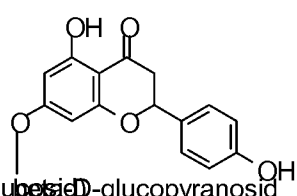
[0033] Im Folgenden sind einige der bevorzugt einzusetzenden Flavanone exemplarisch abgebildet:



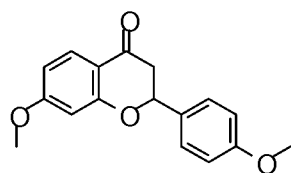
Naringenin



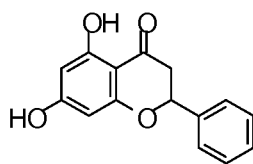
Naringin



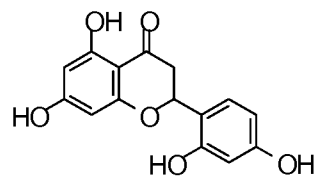
Narirutin



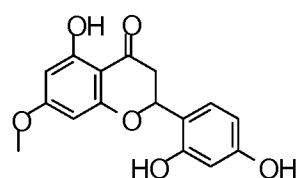
Liquiritigenin



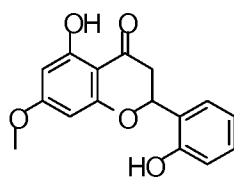
Pinocembrin



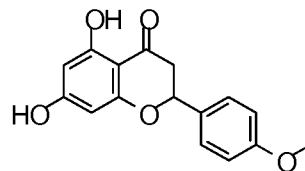
Steppogenin



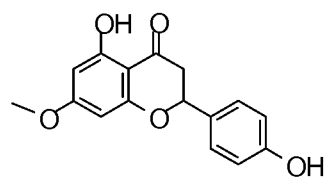
Scuteamoenin



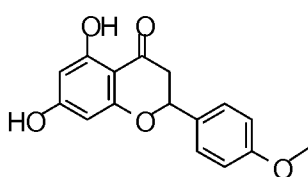
Dihydroechiodinin



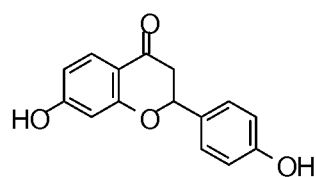
Ponciretin



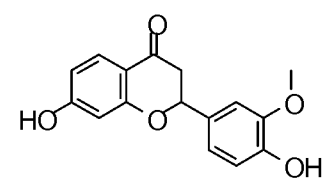
Sakuranetin



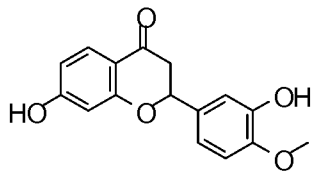
Isosakuranetin



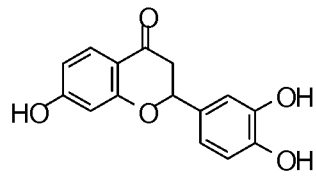
4,7-Dihydroxy-flavanon



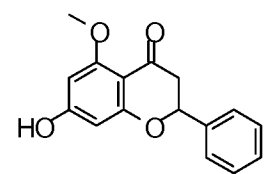
4,7-Dihydroxy-3'-methoxyflavanon



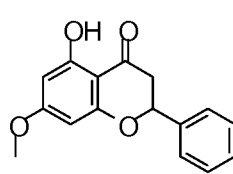
3,7-Dihydroxy-4'-methoxyflavanon



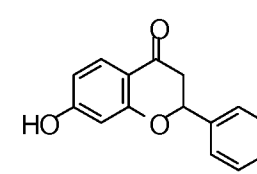
3',4,7-Trihydroxy-flavanon



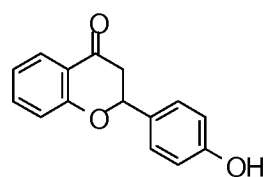
Alpinetin



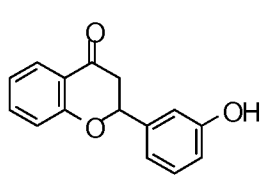
Pinostrobin



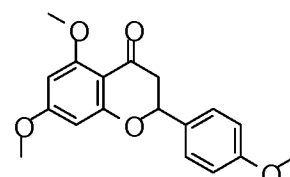
7-Hydroxyflavanon



4'-Hydroxyflavanon



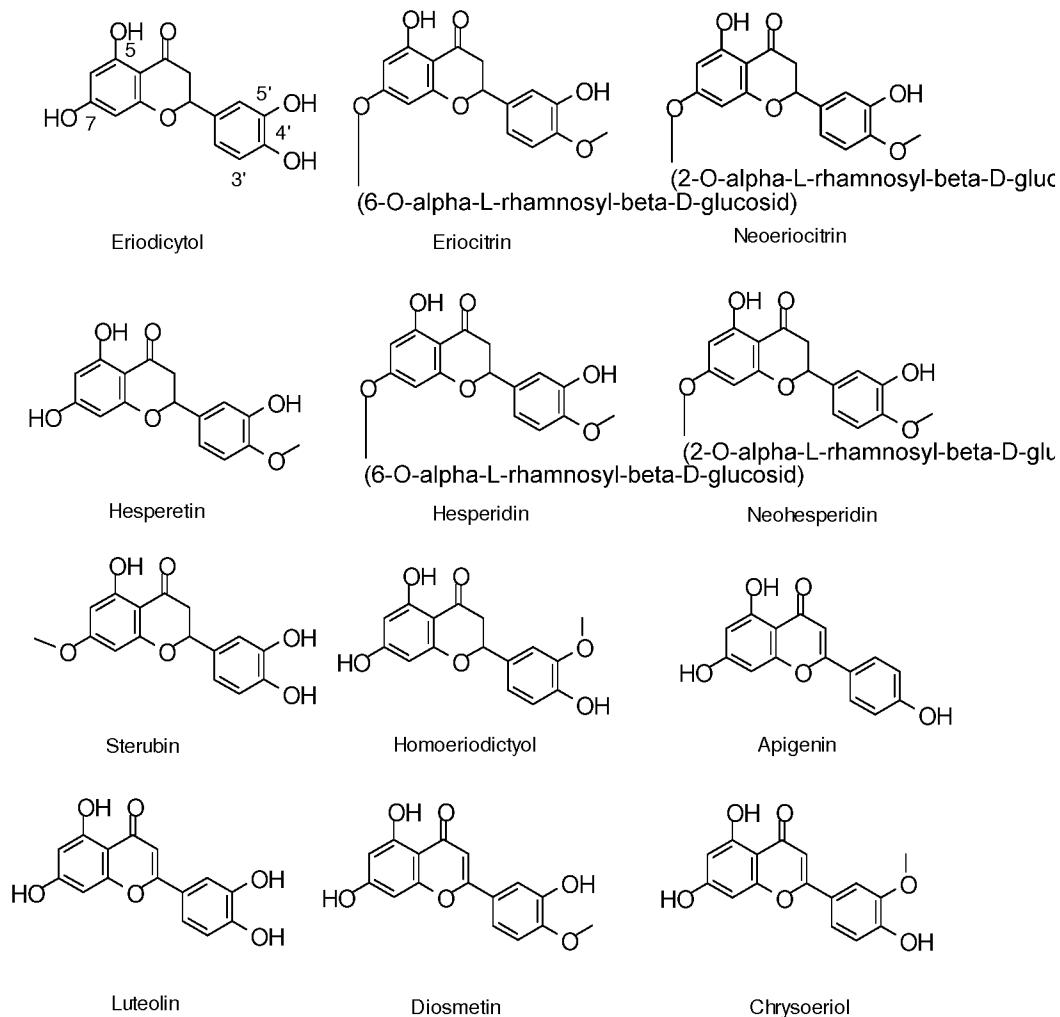
3-Hydroxyflavanon



Tsugafolin

[0034] Die erfindungsgemäß herzustellenden Flavonoide sind vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: Eriodictyol und dessen Glycoside (z.B. Eriocitrin, Neoeriocitrin), Homoeriodictyol und dessen Glycoside, Sterubin und dessen Glycoside, Hesperidin, Hesperetin und andere Hesperetinglycoside (z.B. Neoesperidin), Apigenin und dessen Glycoside, Luteolin, Diosmetin, Chrysoeriol

[0035] Im Folgenden sind erfindungsgemäß besonders bevorzugte Flavonoide abgebildet:



[0036] Besonders bevorzugte Flavanone und die jeweils daraus gebildeten Flavonoide sind: Naringenin und Eriodictyol, Naringenin und Homoeriodictyol, Naringenin und Sterubin, Naringenin und Hesperetin, Naringenin und Eriodictyol, Naringenin und Homoeriodictyol, Naringenin und Hesperetin, Naringenin und Apigenin, Naringenin und Luteolin, Naringenin und Sterubin, Naringenin und Diosmetin, Naringenin und Chrysoeriol, Naringenin und Luteolin, Naringenin und Sterubin, Naringenin und Diosmetin sowie Naringenin und Chrysoeriol.

[0037] KULTIVIERUNG; EXPRESSION UND ISOLIERUNG

[0038] Wie oben beschrieben wird bzw. werden in Schritt (ii) eines erfindungsgemäßen Verfahrens ein oder mehrere Flavanone zu dem transgenen Mikroorganismus hinzugefügt, wobei der transgene Mikroorganismus unter Bedingungen kultiviert wird, die die Umsetzung des bzw. der Flavanone ermöglichen.

[0039] Gemäß einer bevorzugten Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens werden die transgenen Mikroorganismen zunächst, d.h. vor Schritt (ii), unter aeroben Bedingungen, vorzugsweise bis zum Erreichen einer maximalen Biomassenkonzentration, kultiviert. Dabei sollte die OD₆₀₀ bevorzugt wenigstens im Bereich von 1 bis 15 oder darüber liegen, vorzugsweise im Bereich von 5 bis 300, insbesondere im Bereich von 10 bis 275, bevorzugt im Bereich von 15 bis 250. Anschließend werden die Mikroorganismen in Schritt (ii) bevorzugt unter anaeroben Bedingungen kultiviert, wobei die Expression der gewünschten Aminosäuresequenzen bzw. der gewünschten Enzyme auf Basis der eingeschleusten Nukleinsäure-Abschnitte bzw. der eingeschleusten Transgene erfolgt, beispielsweise angeregt mittels Induktion durch IPTG und/oder Lactose (bei Verwendung eines entsprechenden, geeigneten Promotors bzw. eines entsprechenden, geeigneten Expressionssystems).

[0040] Grundsätzlich ist es erfindungsgemäß bevorzugt, wenn die Inkubation in Schritt (ii) zumindest teilweise oder vollständig unter aeroben Bedingungen erfolgt.

[0041] Je nach Mikroorganismus kann der Fachmann in Schritt (ii) für die Zwecke der vorliegenden Erfindung geeignete Umgebungsbedingungen schaffen und insbesondere ein geeignetes (Kultivierungs-)Medium bereitstellen. Die Kultivierung erfolgt vorzugsweise in LB- oder TB-Medium. Alternativ kann ein (komplexeres) Medium bestehend oder umfassend pflanzliche Rohstoffe, insbesondere aus Zitrus-, Grapefruit- und Orange-Pflanzen, verwendet werden. Die Kultivierung erfolgt beispielsweise bei einer Temperatur von mehr als 20 °C, bevorzugt von mehr als 25 °C, insbesondere von mehr als 30 °C (bevorzugt im Bereich von 30 bis 40 °C), was insbesondere die Bildung von Homoeriodictyol aus Naringenin begünstigen bzw. die Ausbeute erhöhen kann. Weiterhin kann auch eine Temperatur zur Induktion (vgl. oben) von weniger als 40 °C, insbesondere von weniger als 35 °C (bevorzugt im Bereich von 20 bis 30 °C), die Bildung von Homoeriodictyol begünstigen bzw. die Ausbeute erhöhen.

[0042] Die Flavonoide werden bezogen auf das (Kultivierungs-) Medium, das die transgenen Mikroorganismen enthält, in Schritt (ii) vorzugsweise in einer Menge von 0,1 mM bis 100 mM (mMol / L), bevorzugt von 0,5 bis 95 mM, besonders bevorzugt von 1 bis 90 mM, zu dem transgenen Mikroorganismus hinzugefügt. Hierbei können geeignete (Ko-)Solventien zum Einsatz kommen.

[0043] Falls zur Induktion (z.B. des lac-operons) ein oder mehrere geeignete Induktoren, z.B. IPTG oder Lactose, verwendet werden, ist es bevorzugt, den Induktor bezogen auf das (Kultivierungs-)Medium, das die transgenen Mikroorganismen enthält, in Schritt (ii) in einer Menge von 0,001 bis 1 mM, bevorzugt von 0,005 bis 0,9 mM, besonders bevorzugt von 0,01 bis 0,8 mM, einzusetzen, da hierbei besonders gute Ausbeuten erzielt werden können.

[0044] Zu Isolierung oder Aufreinigung der exprimierten Flavonoide kann beispielsweise Extraktionen mit organischen Lösemitteln vorgenommen werden. Diese sind bevorzugt ausgewählt aus der folgenden Liste: Isobutan, 2-Propanol, Toluol, Methylacetat, Cyclohexan, 2-Butanol, Hexan, 1-Propanol, Light petroleum, 1,1,1,2-Tetrafluorethan, Methanol, Propan,

1-Butanol, Butan, Ethylmethylketon, Ethylacetat, Diethylether, Ethanol, Dibutylether, CO₂, tert. Butylmethylether, Aceton, Dichloromethan und N₂O. Besonders bevorzugt sind solche Lösungsmittel, die mit Wasser eine optisch erkennbare Phasengrenze ausbilden. Hiernach kann sich eine Entfernung des Restwassers im Lösemittel sowie die Entfernung des

5 Lösemittels selbst anbieten, an die sich wiederum ein Rücklösen des Dihydrochalkons in einem (ggf. anderen) Lösemittel anschließen kann, welches z.B. für eine gegebenenfalls nachfolgende Kristallisation und Trocknung des Produkts geeignet ist. Alternativ oder ergänzend können eine adsorptive, eine destillative und/oder eine chromatographische Aufreinigung erfolgen.

10 **[0045]** Alternativ können zur Isolierung oder Aufreinigung der gebildeten Flavonoide Verfahren der Trocknung, insbesondere Verfahren der Vakuumbandtrocknung, Sprühtrocknung, Destillation oder Lyophilisation der zellhaltigen oder -freien Fermentationslösung verwendet werden.

15 **[0046] TRANSGENE MIKROORGANISMEN**

[0047] Unter einem „transgenen Mikroorganismus“ ist im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein gentechnisch veränderter bzw. modifizierter Mikroorganismus zu verstehen, in den gezielt mittels biotechnologischer Verfahren Nukleinsäure-Abschnitte (siehe Nukleinsäure-Abschnitte (A) und (B) wie hierin beschrieben) bzw. Gene eines anderen

20 Organismus (sog. Transgene) eingeschleust worden sind.

[0048] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung umfasst daher einen transgener Mikroorganismus, enthaltend

- (i) einen ersten Nukleinsäure-Abschnitt (A) enthaltend ein für eine bakterielle CYP450 Oxidase kodierendes Gen, sowie
- 25 (ii) einen zweiten Nukleinsäure-Abschnitt (B), enthaltend ein für eine pflanzliche O-Methyltransferase kodierendes Gen.

[0049] Vorzugsweise handelt es sich dabei um einen Mikroorganismus ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus fakultativ anaeroben Mikroorganismen, insbesondere fakultativ anaeroben Bakterien, bevorzugt Proteobakterien, insbesondere Enterobakterien, zum

30 Beispiel der Gattung *Escherichia*, bevorzugt *E. coli*, insbesondere *E. coli* K12, *E. coli* BL21 und *E. coli* MG1655 und deren Abkömmlinge, Hefen, zum Beispiel *S. cerevesiae* und *P. pastoris*, *K. lactis*, *H. polymorpha* sowie Pilze wie *Aspergillus spp.* oder *Trichoderma spp.*.

[0050] Der erfindungsgemäße transgene Mikroorganismus zeichnet sich insbesondere dadurch aus, dass

- 35 (i) das für eine CYP450-Oxidase kodierende Gen für eine CYP450-Oxidase aus dem Mikroorganismus *Bacillus megaterium* (BM3), vorzugsweise für die F88V Variante der BM3, insbesondere für die A75G/F88V Variante der BM3, besonders bevorzugt für die Variante A75G/F88V/L189Q/R472C der BM3 oder für die Variante A75G/F88V/L189Q/A331S/R472C der BM3 kodiert, und/oder
- 40 (ii) das für eine O-Methyltransferase kodierende Gen für eine O-Methyltransferase aus einer Pflanze der Ordnung der Brassicales, vorzugsweise der Familie der Brassicaceae, bevorzugt der Unterfamilie der Camelinae, insbesondere der Gattung der

Arabidopsis, vor allem der Art *Arabidopsis thaliana*, oder der Ordnung der Caryophyllales, vorzugsweise der Familie der Aizoaceae, bevorzugt der Unterfamilie der Mesembryanthemoideae, insbesondere der Gattung der *Mesembryanthemum*, vor allem der Art *Mesembryanthemum crystallinum*, also besonders bevorzugt für eine O-methyltransferase aus *A. thaliana* oder *M. crystallinum* kodiert.

[0051] Methoden, um auf Basis der eingeschleusten Nukleinsäure-Abschnitte bzw. der Transgene eine Expression der gewünschten Aminosäuresequenzen bzw. der gewünschten Enzyme zu ermöglichen, sind dem Fachmann ebenfalls hinreichend bekannt, z.B. unter Verwendung eines regulatorischen Elements, insbesondere eines Promotors.

[0052] VEKTOR

[0053] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft einen Vektor, d.h. ein Transportvesikel („Genfähre“) zur Übertragung von Fremd-Nukleinsäure(n) in eine Empfängerzelle, insbesondere einen Plasmidvektor, der das Klonieren eines oder mehrerer Nukleinsäure-Abschnitte ermöglicht, enthaltend

- (i) einen ersten Nukleinsäure-Abschnitt (A) enthaltend ein für eine bakterielle CYP450 Oxidase kodierendes Gen, sowie
- (ii) einen zweiten Nukleinsäure-Abschnitt (B), enthaltend ein für eine pflanzliche O-Methyltransferase kodierendes Gen.

[0054] Ebenfalls umfasst die Erfindung einen Vektor, vorzugsweise einen Plasmidvektor, der sich dadurch auszeichnet, dass er

- (i) einen ersten Nukleinsäure-Abschnitt (A) enthaltend ein für eine bakterielle CYP450 Oxidase kodierendes Gen, sowie
- (ii) einen zweiten Nukleinsäure-Abschnitt (B), enthaltend ein für eine pflanzliche O-Methyltransferase kodierendes Gen

aufweist.

[0055] Neben Nukleinsäure-Abschnitt(en) (A) und (B) kann ein erfindungsgemäßer Vektor für die Zwecke der vorliegenden Erfindung gegebenenfalls weitere übliche Bestandteile, insbesondere solche, die die Expression der hierin beschriebenen Transgene in Mikroorganismen, insbesondere in solchen wie oben beschrieben, verbessern oder gegebenenfalls erst ermöglichen. Grundsätzlich enthält ein erfindungsgemäßer Vektor vorzugsweise zudem einen oder mehrere weitere Bestandteile bzw. Elemente ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Promotor, ori-Sequenz, Sequenz zur affinitätschromatographischen Reinigung, Selektionsmarker, Operatorsequenz, Terminator, ribosomale Bindestellen, Proteasespaltsequenz, Rekombinationsbindestellen, Sequenzen von Fusionsproteinen und Chaperonsequenzen.

[0056] WIRTSZELLE

[0057] Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine Wirtszelle, enthaltend ein oder mehrere identische oder unterschiedliche erfindungsgemäße Vektoren wie hierin beschrieben. Erfindungsgemäß bevorzugt ist eine Wirtszelle, die sowohl ein oder mehrere Vektoren ...

[0058] Bei einer erfindungsgemäßen Wirtszelle handelt es sich vorzugsweise um einen erfindungsgemäß einzusetzenden bzw. einen erfindungsgemäßen Mikroorganismus (wie oben beschrieben). Die hierin beschriebenen erfindungsgemäßen Wirtszellen bzw. erfindungsgemäßen oder erfindungsgemäß einzusetzenden Mikroorganismen sind bzw. dienen vorzugsweise als (Produktions-)Stamm zur biotechnologischen Herstellung hierin beschriebener Flavonoide, insbesondere von Eriodictyol, Hesperetin, Sterubin und/oder Homoeriodictyol

[0059] ZUBEREITUNGEN

[0060] Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens lassen sich somit Flavanone auf biotechnologischem Wege in Flavonoide umwandeln, die dadurch charakterisiert sind, dass sie weniger bitter und süßer schmecken als die Ausgangszubereitung und gleichzeitig als natürlich oder naturidentisch bezeichnet werden dürfen.

[0061] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher auf Nahrungsmittelzubereitungen gerichtet, die die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltenen Flavonoide enthalten bzw. ein Verfahren zur Verbesserung des Geschmacks des Flavanon-haltigen Lebensmittels, umfassend die Umwandlung des Lebensmittels durch das oben beschriebene Verfahren.

[0062] Die so erhaltenen Flavanon-haltigen Lebensmittel oder zur Lebensmittelherstellung geeigneten Zubereitungen werden dann mit den erfindungsgemäßen Verfahren in Flavanoid-haltige, natürlich bezeichnenbare Zubereitungen umgewandelt und können dann als solche verwendet werden oder nach Entfernung der Wirtszelle und/oder deren Bestandteilen und optionaler Aufkonzentration durch physikalische Prozesse als zur Lebensmittelherstellung geeigneten Zubereitung, bevorzugt als zur Lebensmittelherstellung geeigneten Zubereitung mit bittermaskierender oder süßverstärkender Wirkung eingesetzt werden.

[0063] Beispiele für geeignete Nahrungsmittel umfassen insbesondere Süßwaren (beispielsweise Schokoladen, Schokoladenriegelprodukte, sonstige Riegelprodukte, Fruchtgummi, Hart- und Weichkaramellen, Kaugummi), alkoholische oder nicht-alkoholische Getränke (beispielsweise Kaffee, Tee, Eistee, Wein, weinhaltige Getränke, Bier, bierhaltige Getränke, Liköre, Schnäpse, Weinbrände, (carbonisierte) fruchthaltige Limonaden, (carbonisierte) isotonische Getränke, (carbonisierte) Erfrischungsgetränke, Nektare, Schorlen, Obst- und Gemüsesäfte, Frucht- oder Gemüsesaftzubereitungen sowie Instantgetränke (beispielsweise Instant-Kakao-Getränke, Instant-Tee-Getränke, Instant-Kaffeegetränke, Instant-Fruchtgetränke).

[0064] Besonders bevorzugt sind dabei als Flavanon-haltigen Lebensmittel Zitrus-säfte, insbesondere Orangensäfte, die einen hohen Gehalt an Naringin enthalten und durch das erfindungsgemäße Verfahren in erfindungsgemäße Flavanoid-haltige Orangensäfte umgewandelt werden können.

BEISPIELE

[0065] BEISPIEL 1

- 5 Bereitstellen transgener Mikroorganismen (vgl. Schritt (i))

[0066] Transformation

- 10 [0067] Auf 50 µl aliquotierte chemisch kompetente E. coli BL21(DE) Zellen wurden für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 100 ng Plasmid-DNA (pSYM_BM3) wurde die Suspension gerührt und für weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte indem die Suspension für 30 s bei 42 °C in einem Wasserbad und nachfolgend für 5 min in Eiswasser überführt wurde. Danach wurden 250 µl S.O.C. Medium zugegeben und die Zellen wurden für 1 h bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Letztlich wurden 200 µL der Kultur auf LB-Agar mit dem jeweiligen Antibiotikum ausgestrichen. Die Petrischale wurde für 14 h
15 bei 37°C inkubiert.

[0068] Mutagenese

- 20 [0069] Es wurde der QuickChange II Site-Directed Mutagenese Kit der Firma Agilent verwendet. Mit Hilfe von spezifischen Primern (Tabelle 1), welche die gewünschte Mutation samt angrenzenden unmodifizierten Bereichen enthalten, wurde eine PCR mit der BM3-Plasmid-DNA durchgeführt. Anschließend wurde der PCR-Reaktionsansatz für 2 Minuten auf Eis platziert. Danach erfolgte die Zugabe von 10 U Dpn I, wobei die Reaktion für 1 h bei 37 °C inkubiert wird. Die Primersequenzen für die Mutagenese sind in **Tabelle 1** wiedergegeben.

- 25 [0070] **Tabelle 1**
Primersequenzen für die Mutagenese

BM3_75G_fwd	TTGATAAAACTTAAGTCAAGGTCTTAAATTTGTACGTGATTT
BM3_75G_rev	AAATCACGTACAAATTTAAGACCTTGACTTAAGTTTTATCAA
BM3_189Q_fwd	TGGATGAAGCAATGAACAAGCAGCAGCGAGCAAATCCAGACGA
BM3_189Q_rev	TCGTCTGGATTTGCTCGCTGCTGCTTGTTTCATTGCTTCATCCA
BM3_331S_fwd	TATGGCCAACTGCTCCTTCGTTTTCCCTAT
BM3_331S_rev	ATAGGGAAAACGAAGGAGCAGTTGGCCATA

[0071] BEISPIEL 2

Biotechnologische Herstellung von Eriodictyol (vgl. Schritt (ii))

[0072] Enzymatische Darstellung von Eriodictyol

5 **[0073]** 200 μ M Naringenin wurden in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,5 gelöst und zusammen mit 5 mM Glucose-6-phosphat, 14 U Glucose-6-phosphat dehydrogenase, 100 μ M NADPH und 50 μ L Zellextrakt (0,5 - 1 μ M CYP450) in einem Gesamtvolumen von 1 mL für 14 h bei 25°C und 200 rpm inkubiert. Nachfolgend wurde die Reaktionslösung zweimal mit 500 μ L Ethylacetat extrahiert, wobei die organischen Phasen vereinigt wurden und das
10 Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde.

[0074] Fermentative Darstellung von Eriodictyol

[0075] Mit pSYM_BM3 transformierte E. coli BL21 (DE3)-Zellen wurden in LB-Medium bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,7 kultiviert und die Proteinproduktion durch Zugabe
15 von 1 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid induziert. Nach der Inkubationszeit von 3 h wurden die Kulturen direkt mit 200 μ M Eriodictyol versetzt und bei 37 °C für 14 h inkubiert. Die Kulturen wurden bei 20.000 x g für 10 min zentrifugiert und mit dem dreifachen Volumen an Ethylacetat extrahiert, die organische Phase mit einer gesättigten Kochsalzlösung gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert.

20

[0076] BEISPIEL 3

Biotechnologische Herstellung von Homoeriodictyol und/oder Hesperertin (vgl. Schritt (ii))

[0077] Enzymatische Darstellung von Homoeriodictyol

25 **[0078]** 20 μ M Eriodictyol wurden in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 gelöst und zusammen mit 1 μ M PfOMT, 250 μ M Magnesiumchlorid und 1 mM S-Adenosylmethionin für 10 Minuten bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Nachfolgend wurde die Reaktionslösung zweimal mit 500 μ L Ethylacetat extrahiert, wobei die organischen Phasen vereinigt wurden und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde.

30

[0079] Fermentative Darstellung von Homoeriodictyol (vgl. Schritt (ii))

[0080] Mit pSYM_BM3 und pSYM_PfOMT transformierte Zellen wurden in ZYM-5052 1:20 mit Starterkultur sowie mit 200 μ M Naringenin angeimpft und bei 38°C und 200 rpm für 24 h inkubiert. Der Verlauf der optischen Dichte, der Genexpression und des Substratumsatzes
35 wurden regelmäßige Entnahme von 1 mL Proben verfolgt. Zur Analyse wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 14.000 x g für 10 Minuten geerntet und mittels 150 μ L B-PER II-Reagenz (Thermo Scientific, Rockford) mit 50 μ L DNase I nach Herstellerangaben aufgeschlossen. Die erhaltenen Proben wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert. Zur Analyse der Substratumsatzung wurden 1 mL der Kultur zweimal mit 500 μ L
40 Ethylacetat extrahiert, wobei die organischen Phasen vereinigt wurden und das

Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde. Die Proben wurden nachfolgend in Acetonitril aufgenommen und mittels HPLC und UPLC-MS/MS analysiert.

[0081] Enzymatische Darstellung von Hesperetin

- 5 **[0082]** 20 μ M Eriodicytol wurden in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 gelöst und zusammen mit 1 μ M AOMT, 250 μ M Magnesiumchlorid und 1 mM S-Adenosylmethionin für 10 Minuten bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Nachfolgend wurde die Reaktionslösung zweimal mit 500 μ L Ethylacetat extrahiert, wobei die organischen Phasen vereinigt wurden und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde.

10

[0083] Fermentative Darstellung von Hesperetin

- [0084]** Mit pSYM_BM3 und pSYM_AOMT transformierte Zellen wurden in ZYM-5052 1:20 mit Starterkultur sowie mit 200 μ M Naringenin angeimpft und bei 38°C und 200 rpm für 24 h inkubiert. Der Verlauf der optischen Dichte, der Genexpression und des Substratumsatzes
15 wurden regelmäßige Entnahme von 1 mL Proben verfolgt. Zur Analyse wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 14.000 x g für 10 Minuten geerntet und mittels 150 μ L B-PER II-Reagenz (Thermo Scientific, Rockford) mit 50 μ L DNase I nach Herstellerangaben aufgeschlossen. Die erhaltenen Proben wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert. Zur Analyse der Substratumsetzung wurde 1 mL der Kultur zweimal mit 500 μ L
20 Ethylacetat extrahiert, wobei die organischen Phasen vereinigt wurden und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde. Die Proben wurden nachfolgend in Acetonitril aufgenommen und mittels HPLC und UPLC-MS/MS analysiert.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung von Flavonoiden, umfassend die Schritte:
 - 5 (a) Bereitstellen eines transgenen Mikroorganismus, enthaltend
 - (i) einen ersten Nukleinsäure-Abschnitt (A), umfassend oder bestehend aus einem für eine CYP450-Oxidase kodierenden Gen,
 - (ii) einen zweiten Nukleinsäure-Abschnitt (B), umfassend oder bestehend aus einem für eine pflanzliche O-Methyltransferase kodierenden Gen, sowie
 - 10 (b) Hinzufügen eines oder mehrerer Flavanone zu dem transgenen Mikroorganismus,
 - (c) die Umsetzung der Substrat Flavanone durch des transgenen Mikroorganismus zu den entsprechenden Flavonoiden, sowie gegebenenfalls
 - (d) Isolierung und Aufreinigung der Endprodukte.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass das für eine bakterielle CYP450 Oxidase kodierende Gen für eine Oxidase aus dem Mikroorganismus *Bacillus megaterium* kodiert.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und/oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass das für eine pflanzliche O-Methyltransferase kodierende Gen für eine O-Methyltransferase aus der Pflanzengattung *Mesembryanthemum* kodiert.
- 20 4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet** dass der in den transgenen Mikroorganismus eingebrachte Nukleinsäure-Abschnitt (A)
 - (i-i) eine Nukleotidsequenz gemäß **SEQ ID NO:1** (Nukleotidsequenz der für die A75G/F88V/L189Q/R472C Variante der bakterielle CYP450 aus *B. megaterium* ATCC 14581 kodierenden Gens) und/oder
 - 25 (i-ii) eine Nukleotidsequenz **SEQ ID NO: 2** (Nukleotidsequenz der für die A75G/F88V/L189Q/A331S/R472C Variante der bakterielle CYP450 aus *B. megaterium* ATCC 14581 kodierenden Gens) und/oder
 - (i-iii) eine ähnliche Nukleotidsequenz mit einer Nukleotidsequenz-Identität von 40 % oder mehr zu **SEQ ID NO:1** und/oder **SEQ ID NO:2**, vorzugsweise von 50 % oder mehr, 60 % oder mehr oder 80 % oder mehr, besonders bevorzugt von 95 % oder mehr,
 - 30 umfasst oder daraus besteht.
5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass die CYP450 Oxidase
 - 35 (i-i) eine Nukleotidsequenz gemäß **SEQ ID NO:1** (Nukleotidsequenz der für die A75G/F88V/L189Q/R472C Variante der bakterielle CYP450 aus *B. megaterium* ATCC 14581 kodierenden Gens) und/oder

(i-ii) eine Nukleotidsequenz **SEQ ID NO:2** (Nukleotidsequenz der für die A75G/ F88V/L189Q/A331S/R472C Variante der bakterielle CYP450 aus *B. megaterium* ATCC 14581 kodierenden Gens) und/oder

(i-iii) eine ähnliche Nukleotidsequenz mit einer Nukleotidsequenz-Identität von 40 % oder mehr zu **SEQ ID NO:1** und/oder **SEQ ID NO:2**, vorzugsweise von 50 % oder mehr, 60 % oder mehr oder 80 % oder mehr, besonders bevorzugt von 95 % oder mehr,

enthält.

6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass der in den transgenen Mikroorganismus eingebrachte Aminosäure-Abschnitt (A)

(i-i) eine Aminosäuresequenz gemäß **SEQ ID NO:6** (Aminosäuresequenz der für die A75G/ F88V/L189Q/R472C Variante der bakterielle CYP450 aus *B. megaterium* ATCC 14581 kodierenden Gens) und/oder

(i-ii) eine Aminosäuresequenz **SEQ ID NO:7** (Aminosäuresequenz der für die A75G/ F88V/L189Q/A331S/R472C Variante der bakterielle CYP450 aus *B. megaterium* ATCC 14581 kodierenden Gens) und/oder

(i-iii) eine ähnliche Aminosäuresequenz mit einer Aminosäuresequenz-Identität von 40 % oder mehr zu **SEQ ID NO:6** und/oder **SEQ ID NO:7**, vorzugsweise von 50 % oder mehr, 60 % oder mehr oder 80 % oder mehr, besonders bevorzugt von 95 % oder mehr,

umfasst oder daraus besteht.

7. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass die vorzugsweise bakterielle CYP450 Oxidase

(i-i) eine Aminosäuresequenz gemäß **SEQ ID NO:6** (Aminosäuresequenz der für die A75G/ F88V/L189Q/R472C Variante der bakterielle CYP450 aus *B. megaterium* ATCC 14581 kodierenden Gens) und/oder

(i-ii) eine Aminosäuresequenz **SEQ ID NO:7** (Aminosäuresequenz der für die A75G/ F88V/L189Q/A331S/R472C Variante der bakterielle CYP450 aus *B. megaterium* ATCC 14581 kodierenden Gens) und/oder

(i-iii) eine ähnliche Aminosäuresequenz mit einer Aminosäuresequenz-Identität von 40 % oder mehr zu **SEQ ID NO:6** und/oder **SEQ ID NO:7**, vorzugsweise von 50 % oder mehr, 60 % oder mehr oder 80 % oder mehr, besonders bevorzugt von 95 % oder mehr,

enthält.

8. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet** dass der in den transgenen Mikroorganismus eingebrachte Nukleinsäure-Abschnitt (B)

(ii-i) eine Nukleotidsequenz gemäß **SEQ ID NO:3** (Nukleotidsequenz der OMT aus *M. crystallinum* (McPFOMT)), und/oder

(ii-ii) eine Nukleotidsequenz gemäß **SEQ ID NO:4** (Nukleotidsequenz der O-Methyltransferase 1 (OMT1)) und/oder

(ii-iii) eine Nukleotidsequenz gemäß **SEQ ID NO:5** (Nukleotidsequenz der O-Methyltransferase (AOMT)) und/oder

(ii-iv) eine weitere Nukleotidsequenz mit einer Nukleotidsequenz-Identität von 40 % oder mehr zu **SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:5**, vorzugsweise von 50 % oder mehr, 60 % oder mehr oder 80 % oder mehr, besonders bevorzugt von 95 % oder mehr,

umfasst oder daraus besteht.

9. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass die O-Methyltransferase

(ii-i) eine Nukleotidsequenz gemäß **SEQ ID NO:3** (Nukleotidsequenz der OMT aus *M. crystallinum* (McPFOMT)), und/oder

(ii-ii) eine Nukleotidsequenz gemäß **SEQ ID NO:4** (Nukleotidsequenz der O-Methyltransferase 1 (OMT1)) und/oder

(ii-iii) eine Nukleotidsequenz gemäß **SEQ ID NO:5** (Nukleotidsequenz der O-Methyltransferase (AOMT)) und/oder

(ii-iv) eine weitere Nukleotidsequenz mit einer Nukleotidsequenz-Identität von 40 % oder mehr zu **SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:5**, vorzugsweise von 50 % oder mehr, 60 % oder mehr oder 80 % oder mehr, besonders bevorzugt von 95 % oder mehr,

enthält.

10. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass der in den transgenen Mikroorganismus eingebrachte Aminosäure-Abschnitt (B)

(ii-i) eine Aminosäuresequenz gemäß **SEQ ID NO:8** (Aminosäuresequenz der OMT aus *M. crystallinum* (McPFOMT)), und/oder

(ii-ii) eine Aminosäuresequenz gemäß **SEQ ID NO:9** (Aminosäuresequenz der O-Methyltransferase 1 (OMT1)) und/oder

(ii-iii) eine Aminosäuresequenz gemäß **SEQ ID NO:10** (Aminosäuresequenz der O-Methyltransferase (AOMT)) und/oder

(ii-iv) eine weitere Aminosäuresequenz mit einer Aminosäuresequenz-Identität von 40 % oder mehr zu **SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 und/oder SEQ ID NO:10**, vorzugsweise von 50 % oder mehr, 60 % oder mehr oder 80 % oder mehr, besonders bevorzugt von 95 % oder mehr,

umfasst oder daraus besteht.

11. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die O-Methyltransferase

(ii-i) eine Aminosäuresequenz gemäß **SEQ ID NO:8** (Aminosäuresequenz der OMT aus *M. crystallinum* (McPFOMT)), und/oder

(ii-ii) eine Aminosäuresequenz gemäß **SEQ ID NO:9** (Aminosäuresequenz der O-Methyltransferase 1 (OMT1)) und/oder

(ii-iii) eine Aminosäuresequenz gemäß **SEQ ID NO:10** (Aminosäuresequenz der O-Methyltransferase (AOMT)) und/oder

(ii-iv) eine weitere Aminosäuresequenz mit einer Aminosäuresequenz-Identität von 40 % oder mehr zu **SEQ ID NO:8**, **SEQ ID NO:9** und/oder **SEQ ID NO:10**, vorzugsweise von 50 % oder mehr, 60 % oder mehr oder 80 % oder mehr, besonders bevorzugt von 95 % oder mehr,

enthält.

12. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Flavanone ausgewählt sind aus der Gruppe, die gebildet wird von Naringenin, Naringin, Narirutin, oder anderen natürlich vorkommenden oder künstlich hergestellten Naringeninglycosiden, Sakuranetin, Sakuranetinglycoside, Isosakuranetin, Isosakuranetinglycosiden, 4',7-Dihydroxy-flavanon oder dessen Glycosiden, 4',7-Dihydroxy-3'-methoxy-flavanon oder dessen Glycosiden, 3',7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavanon oder dessen Glycosiden, 3',4',7-Trihydroxy-flavanon oder dessen Glycosiden, wobei die Flavanone bezüglich der 2-Position des Flavanongerüsts als (S)-, als (R)-Enantiomer, als Racemat oder als beliebige Mischung der beiden Enantiomere vorliegen können.

13. Transgener Mikroorganismus, enthaltend

(i) einen ersten Nukleinsäure-Abschnitt (A) enthaltend ein für eine bakterielle CYP450 Oxidase kodierendes Gen, sowie

(ii) einen zweiten Nukleinsäure-Abschnitt (B), enthaltend ein für eine pflanzliche O-Methyltransferase kodierendes Gen.

14. Mikroorganismus nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass es sich um einen fakultativ anaeroben Mikroorganismus handelt.

15. Mikroorganismus nach den Ansprüchen 13 und/oder 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass

(i) das für eine CYP450-Oxidase kodierende Gen für eine CYP450-Oxidase aus dem Mikroorganismus *Bacillus megaterium* (BM3) kodiert, und/oder

(ii) das für eine O-Methyltransferase kodierende Gen für eine O-Methyltransferase aus *A. thaliana* oder *M. crystallinum* kodiert.

16. Vektor, enthaltend

(i) einen ersten Nukleinsäure-Abschnitt (A) enthaltend ein für eine bakterielle CYP450 Oxidase kodierendes Gen, sowie

(ii) einen zweiten Nukleinsäure-Abschnitt (B), enthaltend ein für eine pflanzliche O-Methyltransferase kodierendes Gen.

17. Vektor nach Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet**, dass er

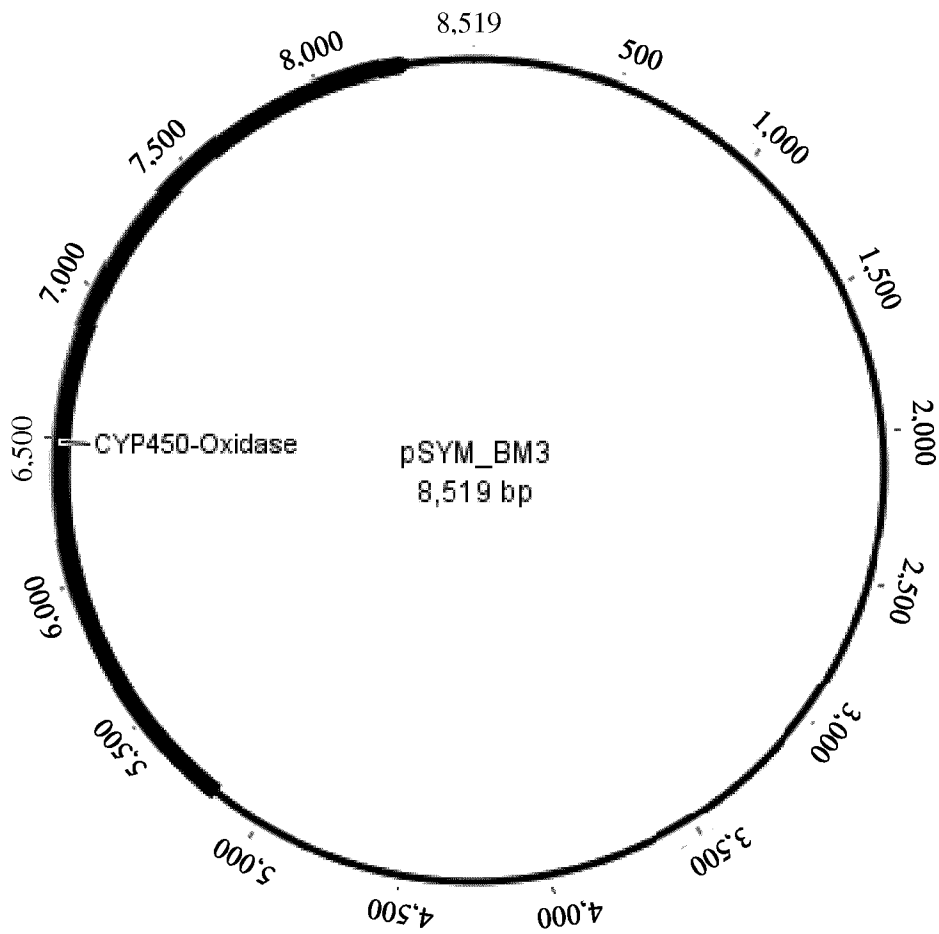
(i) einen ersten Nukleinsäure-Abschnitt (A) enthaltend ein für eine bakterielle CYP450 Oxidase kodierendes Gen, sowie

(ii) einen zweiten Nukleinsäure-Abschnitt (B), enthaltend ein für eine pflanzliche O-Methyltransferase kodierendes Gen.

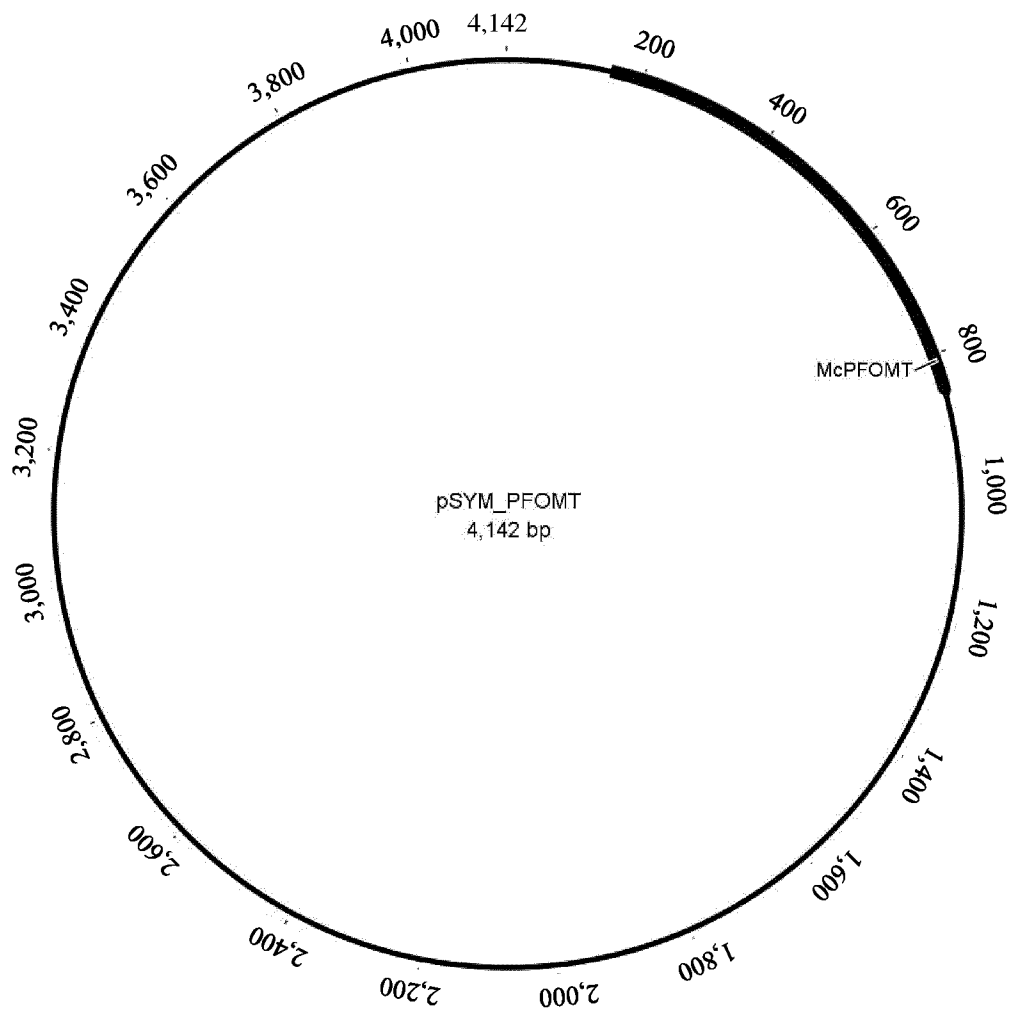
aufweist.

18. Wirtszelle, enthaltend mindestens einen Vektor nach den Ansprüchen 16 und/oder 17.
19. Verfahren zur Verbesserung des Geschmacks des Flavanon-haltigen Lebensmittels, umfassend die Umwandlung des Lebensmittels durch das Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 12.

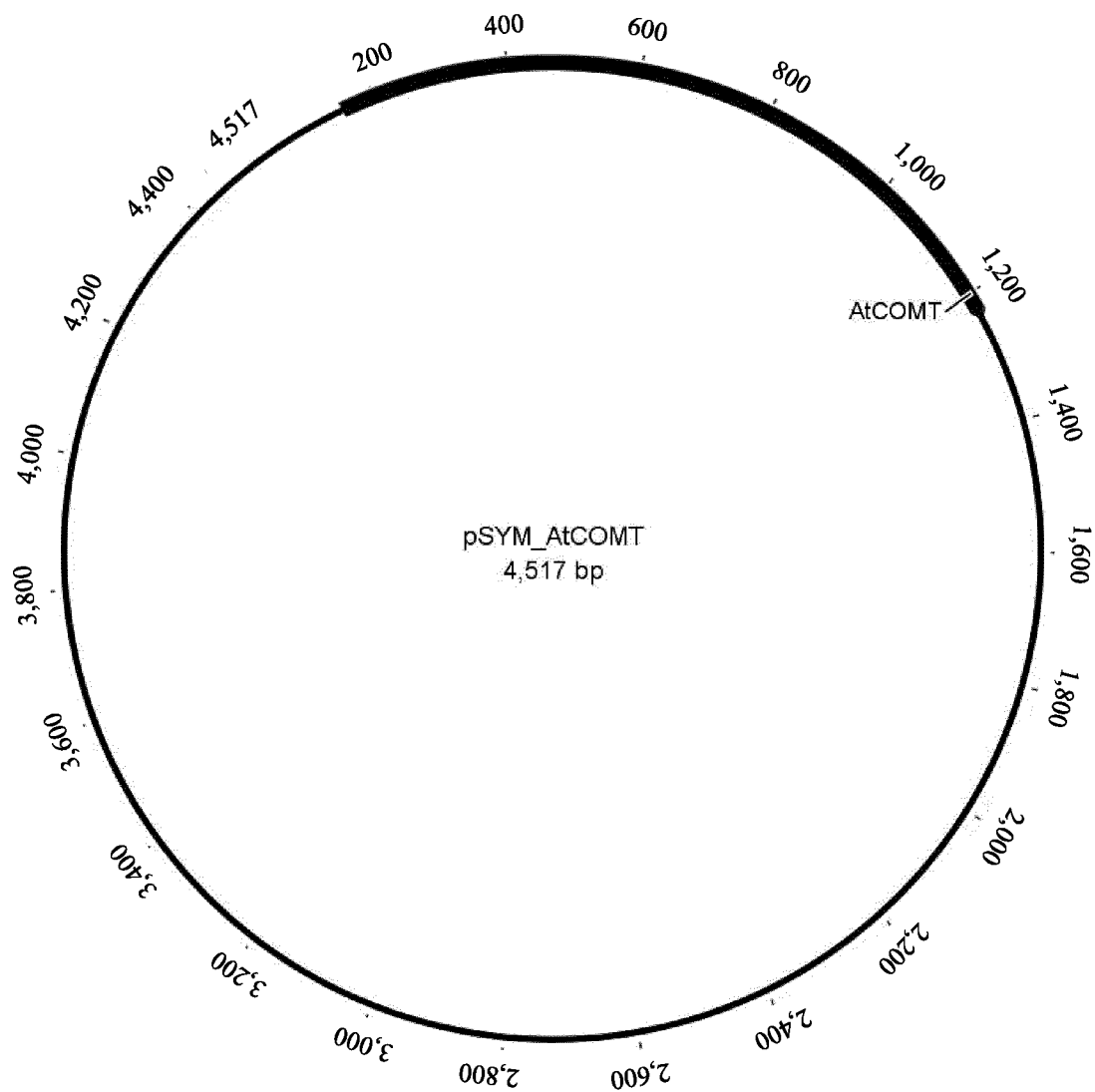
5

**Abbildung 1**

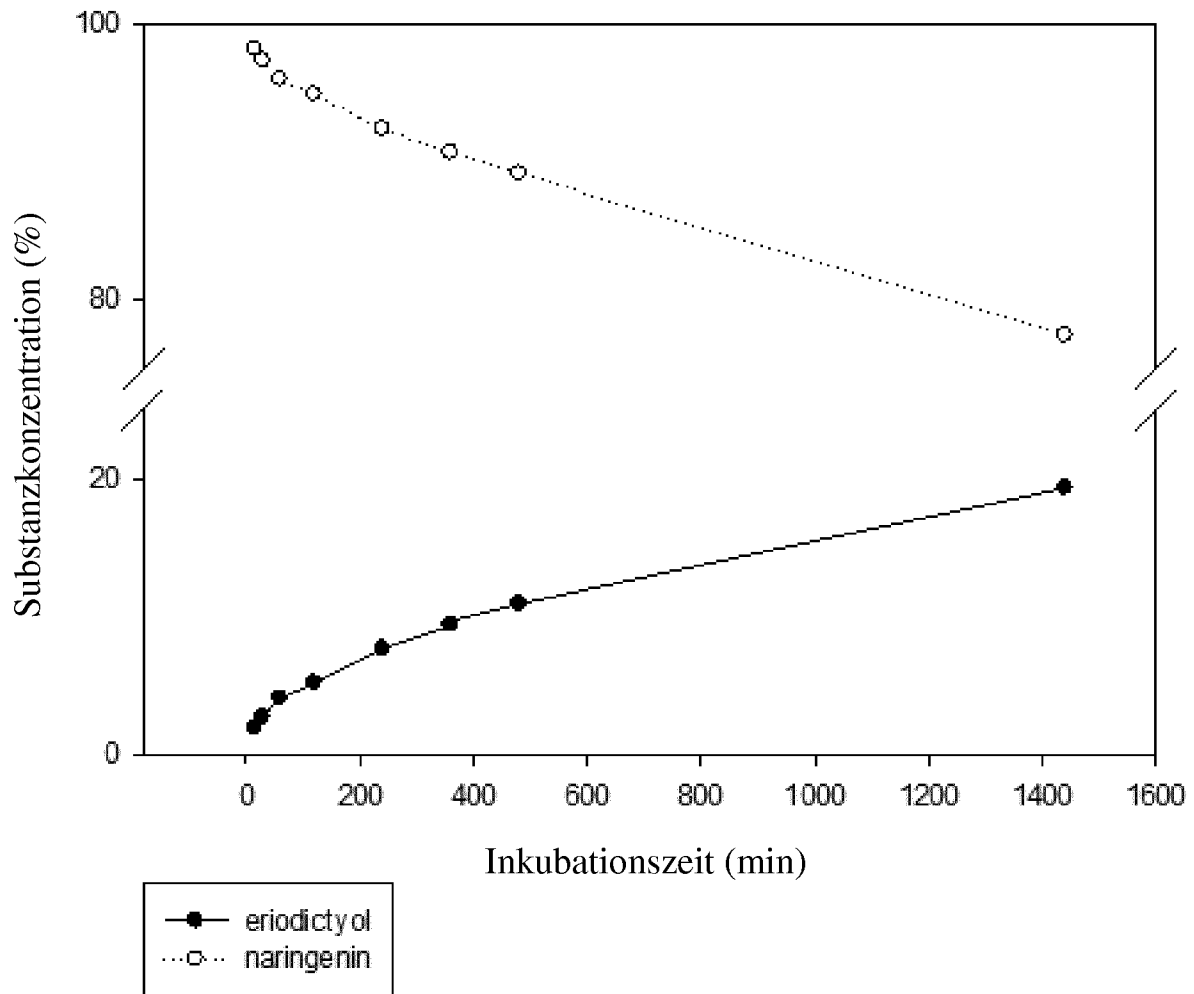
Plasmid pSYM_BM3 mit CYP450-Oxidase-Gen

**Abbildung 2**

Plasmid pSYM_PFOMT Gen kodierend für O-Methyltransferase

**Abbildung 3**

Plasmid pSYM_AtCOMT Gen kodierend für kationenunabhängige O-Methyltransferase

**Abbildung 4**

Biokatalytische Umwandlung von Naringenin in Eriodictyol

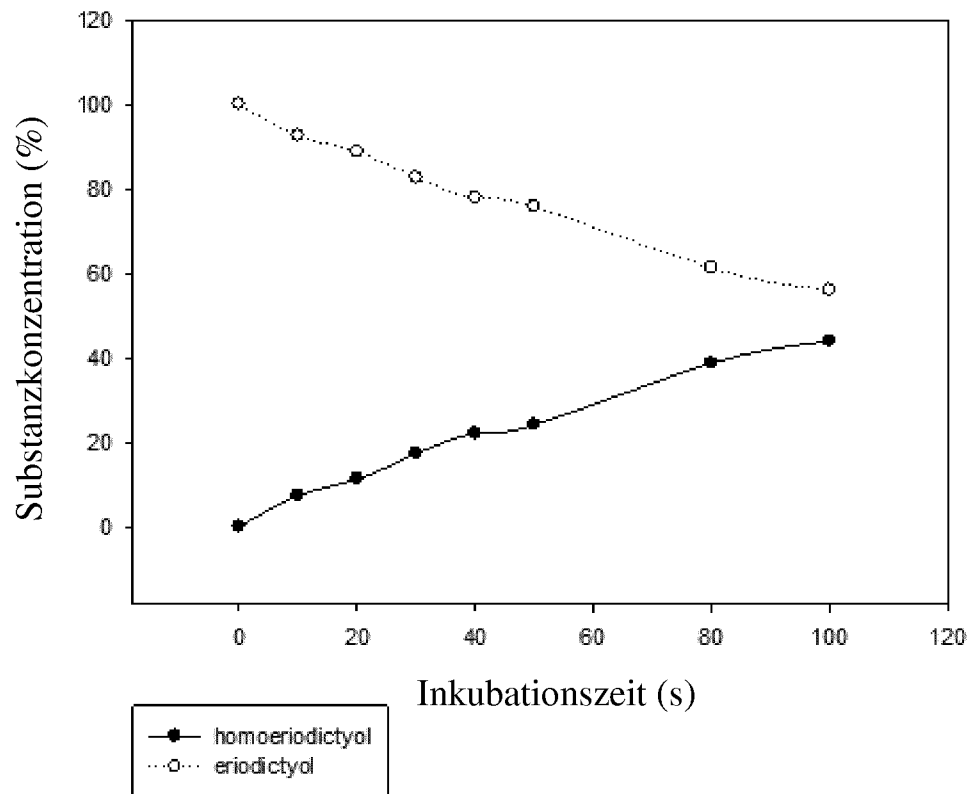


Abbildung 5

Biokatalytische Umwandlung von Eriodictyol in Homoeriodictyol

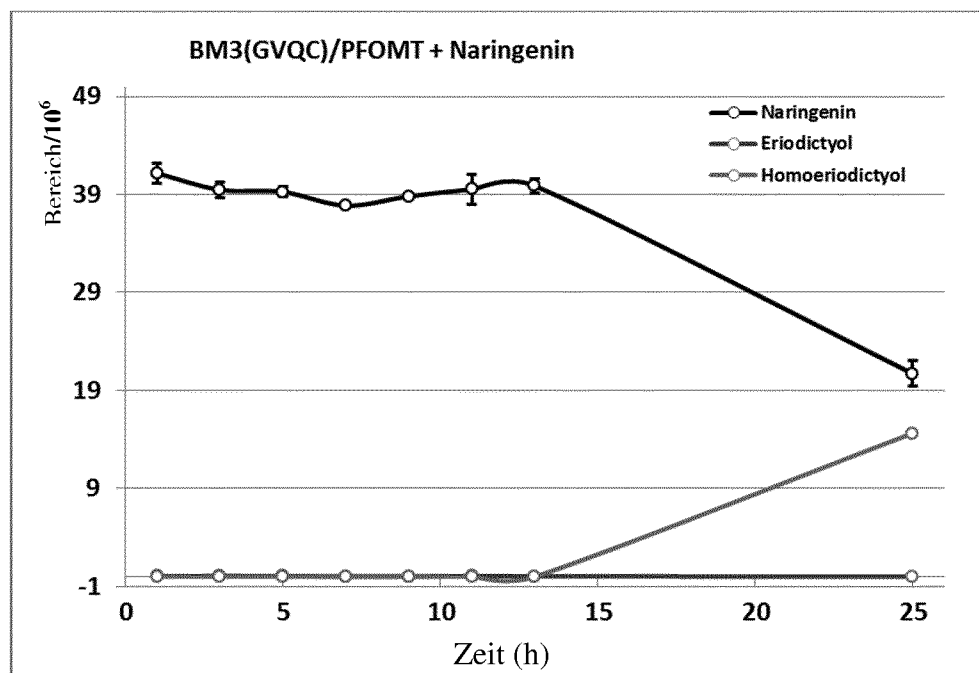
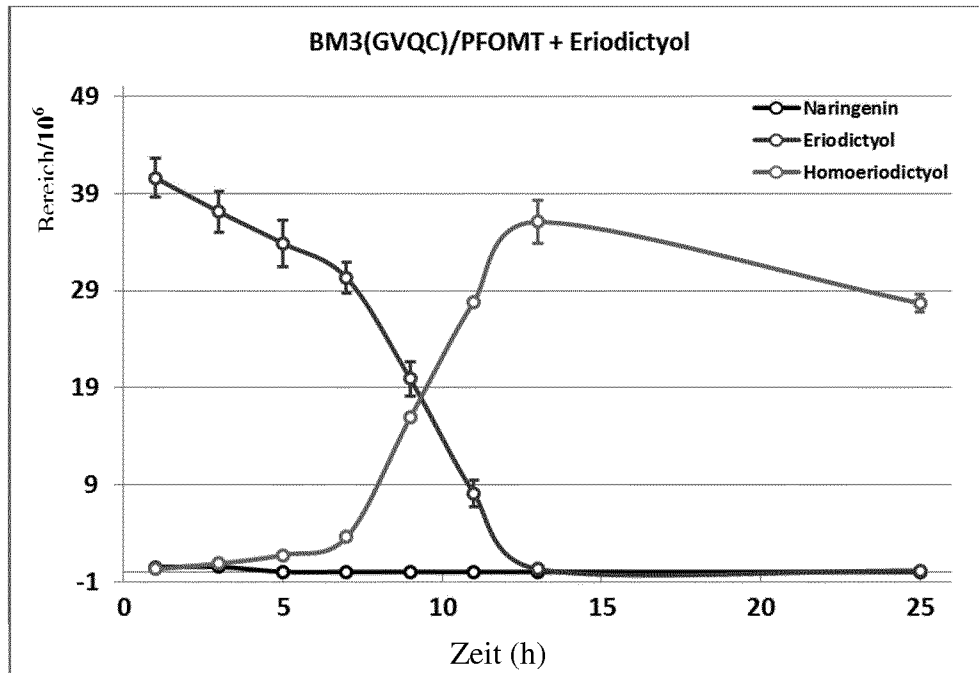
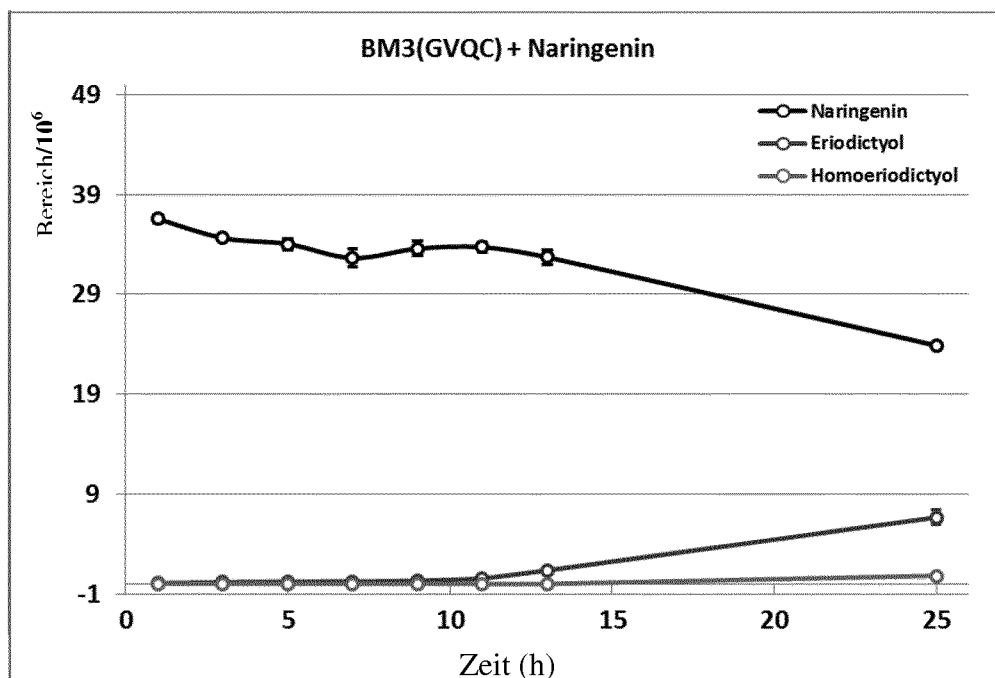


Abbildung 6

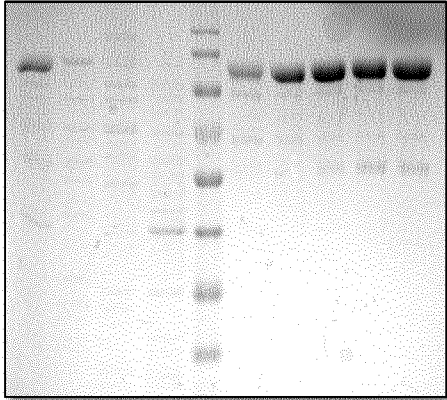
Fermentative Umwandlung von Naringenin zu Homoeriodictyol

**Abbildung 7**

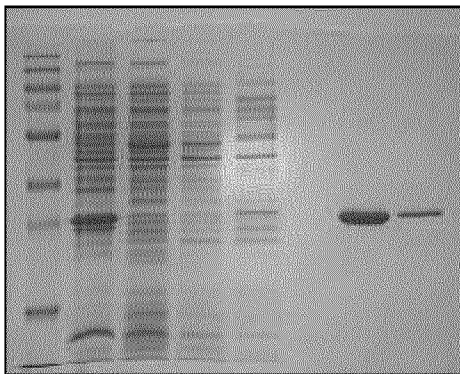
Fermentative Umwandlung von Eriodictyol in Homoeriodictyol

**Abbildung 8**

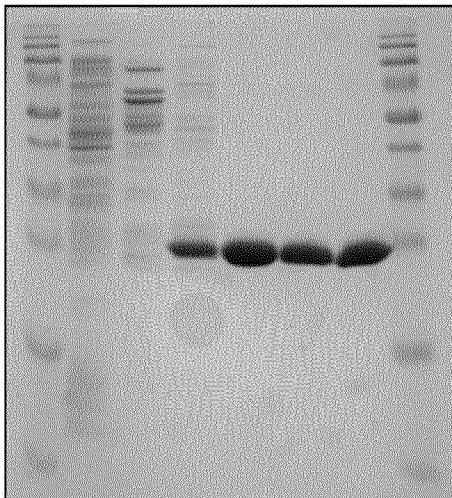
Fermentative Umwandlung von Naringenin in Eriodictyol

**Abbildung 9**

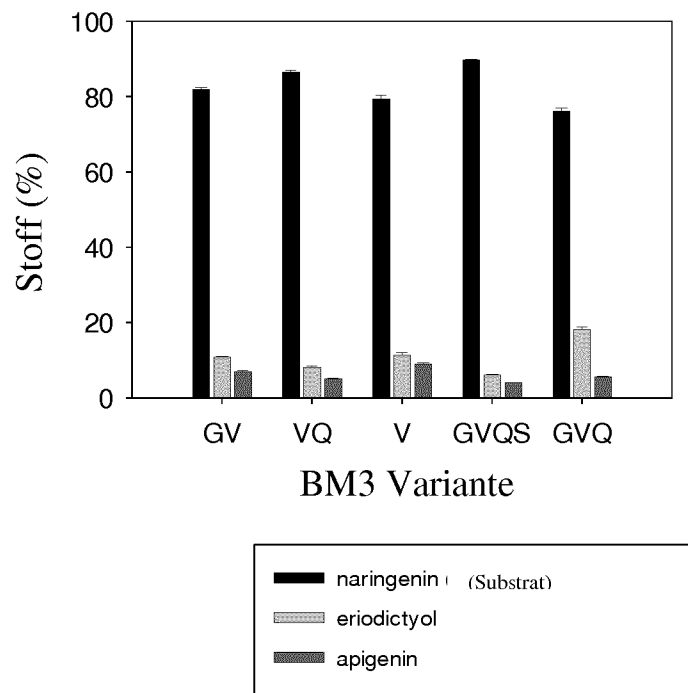
Isolierung der CYP450-Oxidase BM3

**Abbildung 10**

Isolierung der O-Methyltransferase PfOMT

**Abbildung 11**

Isolierung der O-Methyltransferase AtCOMT

**Abbildung 12**

Vergleich der Produktbildung verschiedener Varianten der BM3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2015/072189

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/072189

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12P17/06 C12N9/02 C12N9/10
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Lee Yoon Jung ET AL: "Biotransformation of flavonoids with O-methyltransferase from Bacillus cereu", Journal of Microbiology and Biotechnology, 1 July 2006 (2006-07-01), pages 1090-1096, XP055188134, Korea Retrieved from the Internet: URL: http://dfpcorec-p.internal.epo.org/wf/web/citenpl/citenpl.html [retrieved on 2015-05-07] figure 4 ----- -/-	1-19



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 November 2015

Date of mailing of the international search report

01/12/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schneider, Patrick

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/072189

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EMI KITAMURA ET AL: "Production of Hydroxylated Flavonoids with Cytochrome P450 BM3 Variant F87V and Their Antioxidative Activities", BIOSCIENCE, BIOTECHNOLOGY, AND BIOCHEMISTRY, vol. 77, no. 6, 23 June 2013 (2013-06-23), pages 1340-1343, XP055187653, ISSN: 0916-8451, DOI: 10.1271/bbb.130148 the whole document	1-19
Y	----- LUDGER A WESSJOHANN ET AL: "Alkylating enzymes", CURRENT OPINION IN CHEMICAL BIOLOGY, vol. 17, no. 2, 1 April 2013 (2013-04-01), pages 229-235, XP055188075, ISSN: 1367-5931, DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.02.016 page 232	1
Y	----- KASAI N ET AL: "Enzymatic properties of cytochrome P450 catalyzing 3'-hydroxylation of naringenin from the white-rot fungus Phanerochaete chrysosporium", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 387, no. 1, 11 September 2009 (2009-09-11), pages 103-108, XP026378960, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/J.BBRC.2009.06.134 [retrieved on 2009-07-01] the whole document	1-19
Y	----- HIROKI KABUMOTO ET AL: "Directed Evolution of the Actinomycete Cytochrome P450 MoxA (CYP105) for Enhanced Activity", BIOSCIENCE, BIOTECHNOLOGY, AND BIOCHEMISTRY, vol. 73, no. 9, 23 September 2009 (2009-09-23), pages 1922-1927, XP055187656, ISSN: 0916-8451, DOI: 10.1271/bbb.90013 the whole document	1-19
A	----- WO 2005/115377 A1 (KGK SYNERGIZE INC [CA]; GUTHRIE NAJLA [CA]) 8 December 2005 (2005-12-08) the whole document	1-19
A	----- WO 2005/084305 A2 (UNIV MINNESOTA [US]; SCHMIDT-DANNERT CLAUDIA [US]; WATTS KEVIN [US]) 15 September 2005 (2005-09-15) the whole document	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/072189

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005115377 A1	08-12-2005	AU 2005247160 A1	08-12-2005
		CA 2567963 A1	08-12-2005
		CN 1988902 A	27-06-2007
		EP 1748773 A1	07-02-2007
		KR 20070088324 A	29-08-2007
		US 2006013861 A1	19-01-2006
		US 2009156663 A1	18-06-2009
		WO 2005115377 A1	08-12-2005
		ZA 200610167 A	30-07-2008

WO 2005084305 A2	15-09-2005	CA 2598687 A1	15-09-2005
		EP 1765977 A2	28-03-2007
		US 2005208643 A1	22-09-2005
		WO 2005084305 A2	15-09-2005

Feld Nr. I Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz(en) (Fortsetzung von Punkt 1 c) auf Blatt 1)

1. Hinsichtlich der **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz**, die in der internationalen Anmeldung offenbart wurde, ist die internationale Recherche auf der Grundlage eines Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das
- a) ☒ im Anmeldezeitpunkt Bestandteil der internationalen Anmeldung war und
- ☒ in Form einer Textdatei gemäß Anhang C/ST.25 vorlag.
- ☐ in Papierform oder in Form einer Bilddatei vorlag.
- b) ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung gemäß Regel 13~~ter~~.1 a) PCT nur für die Zwecke der internationalen Recherche in Form einer Textdatei gemäß Anhang C/ST.25 eingereicht wurde.
- c) ☐ nach dem internationalen Anmeldedatum nur für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht wurde, und zwar
- ☐ in Form einer Textdatei gemäß Anhang C/ST.25 (Regel 13~~ter~~.1 a)).
- ☐ in Papierform oder in Form einer Bilddatei (Regel 13~~ter~~.1 b) und Abschnitt 713 der Verwaltungsvorschriften).
2. ☐ In dem Fall, dass mehr als eine Version oder Kopie eines Sequenzprotokolls eingereicht wurde, wurden zusätzlich die erforderlichen Erklärungen eingereicht, dass die Informationen in den nachgereichten oder zusätzlichen Kopien denen entsprechen, die im Anmeldezeitpunkt Bestandteil der Anmeldung waren, bzw. dass sie nicht über den Offenbarungsgehalt der Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgehen.
3. Zusätzliche Bemerkungen:

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

INV. C12P17/06 C12N9/02 C12N9/10
ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

C12P C12N

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	Lee Yoon Jung ET AL: "Biotransformation of flavonoids with O-methyltransferase from Bacillus cereu", Journal of Microbiology and Biotechnology, 1. Juli 2006 (2006-07-01), Seiten 1090-1096, XP055188134, Korea Gefunden im Internet: URL:http://dfpcorec-p.internal.epo.org/wf/web/citenpl/citenpl.html [gefunden am 2015-05-07] Abbildung 4 ----- -/-	1-19



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. November 2015

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

01/12/2015

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Schneider, Patrick

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EMI KITAMURA ET AL: "Production of Hydroxylated Flavonoids with Cytochrome P450 BM3 Variant F87V and Their Antioxidative Activities", BIOSCIENCE, BIOTECHNOLOGY, AND BIOCHEMISTRY, Bd. 77, Nr. 6, 23. Juni 2013 (2013-06-23), Seiten 1340-1343, XP055187653, ISSN: 0916-8451, DOI: 10.1271/bbb.130148 das ganze Dokument	1-19
Y	----- LUDGER A WESSJOHANN ET AL: "Alkylating enzymes", CURRENT OPINION IN CHEMICAL BIOLOGY, Bd. 17, Nr. 2, 1. April 2013 (2013-04-01), Seiten 229-235, XP055188075, ISSN: 1367-5931, DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.02.016 Seite 232	1
Y	----- KASAI N ET AL: "Enzymatic properties of cytochrome P450 catalyzing 3'-hydroxylation of naringenin from the white-rot fungus Phanerochaete chrysosporium", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, Bd. 387, Nr. 1, 11. September 2009 (2009-09-11), Seiten 103-108, XP026378960, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/J.BBRC.2009.06.134 [gefunden am 2009-07-01] das ganze Dokument	1-19
Y	----- HIROKI KABUMOTO ET AL: "Directed Evolution of the Actinomycete Cytochrome P450 MoxA (CYP105) for Enhanced Activity", BIOSCIENCE, BIOTECHNOLOGY, AND BIOCHEMISTRY, Bd. 73, Nr. 9, 23. September 2009 (2009-09-23), Seiten 1922-1927, XP055187656, ISSN: 0916-8451, DOI: 10.1271/bbb.90013 das ganze Dokument	1-19
A	----- WO 2005/115377 A1 (KGK SYNERGIZE INC [CA]; GUTHRIE NAJLA [CA]) 8. Dezember 2005 (2005-12-08) das ganze Dokument	1-19
A	----- WO 2005/084305 A2 (UNIV MINNESOTA [US]; SCHMIDT-DANNERT CLAUDIA [US]; WATTS KEVIN [US]) 15. September 2005 (2005-09-15) das ganze Dokument	1-19

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2015/072189

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument			Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung	
WO 2005115377	A1	08-12-2005	AU	2005247160	A1	08-12-2005		
			CA	2567963	A1	08-12-2005		
			CN	1988902	A	27-06-2007		
			EP	1748773	A1	07-02-2007		
			KR	20070088324	A	29-08-2007		
			US	2006013861	A1	19-01-2006		
			US	2009156663	A1	18-06-2009		
			WO	2005115377	A1	08-12-2005		
			ZA	200610167	A	30-07-2008		

WO 2005084305	A2	15-09-2005	CA	2598687	A1	15-09-2005		
			EP	1765977	A2	28-03-2007		
			US	2005208643	A1	22-09-2005		
			WO	2005084305	A2	15-09-2005		
