



(10) **DE 11 2015 003 962 B4** 2024.12.19

(12) **Patentschrift**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **11 2015 003 962.7**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/KR2015/009061**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2016/032279**
(86) PCT-Anmeldetag: **28.08.2015**
(87) PCT-Veröffentlichungstag: **03.03.2016**
(43) Veröffentlichungstag der PCT Anmeldung
in deutscher Übersetzung: **03.08.2017**
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **19.12.2024**

(51) Int Cl.: **C12N 1/19 (2006.01)**
C12P 7/42 (2006.01)

Innerhalb von neun Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(30) Unionspriorität:
10-2014-0114505 29.08.2014 KR

(73) Patentinhaber:
SK Innovation Co., Ltd., Seoul, KR

(74) Vertreter:
**dompatent von Kreisler Selting Werner -
Partnerschaft von Patentanwälten und
Rechtsanwälten mbB, 50667 Köln, DE**

(72) Erfinder:
**Park, Joong Min, Seoul, KR; Park, Jae Yeon,
Seoul, KR; Park, Woo Chan, Sejong, KR; Lee,
Sang Min, Seoul, KR; Seo, Young Bin, Seoul, KR;**

**Oja, Merja, Espoo, FI; Koivistoinen, Outi, Espoo,
FI; Conley, Andrew, VTT, FI; Ilmen, Marja, Helsinki,
FI; Ruohonen, Laura, Helsinki, FI; Jouhten, Paula,
VTT, FI**

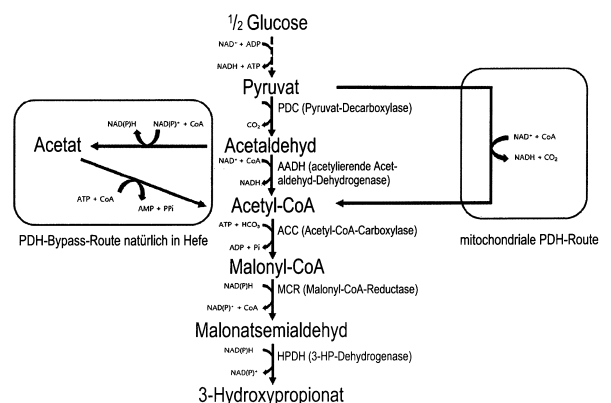
(56) Ermittelte Stand der Technik:

**1. Chen, Y.; u. a.: Coupled incremental
precursor and co-factor supply improves 3-
hydroxypropionic acid production in
Saccharomyces cerevisiae. Online: 4.2.2014. In:
Metabolic Engineering, Vol. 22, S. 104-109.**

(54) Bezeichnung: **3-Hydroxypropionsäure erzeugende rekombinante Hefe und Verfahren zum Herstellen von 3-Hydroxypropionsäure unter Nutzung derselben**

(57) Hauptanspruch: Rekombinante Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, umfassend einen aktiven Stoffwechselweg zur Biosynthese von 3-HP gemäß [Pyruvat → Acetaldehyd → Acetyl-CoA → Malonyl-CoA → Malonatsemialdehyd → 3-HP], wobei die Hefe umfasst:

ein exogenes Gen, das für AADH kodiert, mit einer Aminosäuresequenz ausgewählt aus SEQ ID Nos: 145-176;
ein endo- oder exogenes Gen, das für ACC kodiert, mit einer Aminosäuresequenz ausgewählt aus SEQ ID Nos: 99-106;
ein exogenes Gen, das für MCR kodiert, mit einer Aminosäuresequenz ausgewählt aus SEQ ID Nos: 192-207 und
ein exogenes Gen, das für HPDH kodiert, mit einer Aminosäuresequenz ausgewählt aus SEQ ID Nos: 127-130, 132-133, 137, 140, 142 und 208-275.



Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine 3-Hydroxypropionsäure (3-HP) erzeugende rekombinante Hefe und ein Verfahren zum Herstellen von 3-HP unter Nutzung derselben und betrifft spezieller eine 3-HP erzeugende rekombinante Hefe, umfassend: ein AADH kodierendes exogenes Gen; ein ACC kodierendes endo- oder exogenes Gen, ein MCR kodierendes exogenes Gen; und ein HPDH kodierendes exogenes Gen, sowie Erzeugen von 3-HP über den biosynthetischen Stoffwechselweg [Pyruvat → Acetaldehyd → Acetyl-CoA → Malonyl-CoA → Malonat-Semialdehyd → 3-HP] und ein Verfahren unter Verwendung derselben.

Allgemeiner Stand der Technik

[0002] 3-HP (3-Hydroxypropionsäure, C3) ist ein Isomer der Milchsäure (2-Hydroxypropionsäure) und verfügt an beiden Enden davon über eine Carbonsäuregruppe und eine Hydroxyl-Gruppe und ist dadurch ein nützliches Material, das in verschiedene chemische Substanzen umgewandelt werden kann, wie beispielsweise 1,3-Propandiol, Acrylsäure, Acrylamid, ein Polymer und dergleichen. Wegen der vorgenannten Gründe wurde 3-HP von dem U.S. Department of Energy 2004 sogar als eine der vielversprechenden chemischen Substanzen gewählt, die aus Biomasse erzeugt werden können. Insbesondere könnte Acrylsäure als eine vorrangig eingesetzte Form von 3-HP als besonders marktfähiges, in einem Beschichtungsmaterial, einer Klebmasse, einem Additiv, einer Windel oder dgl. angewendetes Material sein. Theoretisch kann 3-HP aus verschiedener Biomasse erzeugt werden, wie beispielsweise Glucose durch Fermentation bei einer Ausbeute von 100%, und es ist ein Fermentationsprozess unter Verwendung von Mikroorganismen geeignet, um den Bedarf für ein umweltfreundliches und erneuerbares Material zu decken.

[0003] Bisher gibt es noch keinen Fall einer kommerziellen Produktion von 3-HP unter Verwendung von Biomasse, allerdings sind Forschungsarbeiten zu verschiedenen Verfahren ausgeführt worden, wobei sich die Sicherung eines wirtschaftlichen, 3-HP produzierenden Stammes als das Haupthindernis erwiesen hat. Bakterien als repräsentative Mikroorganismen, die organische Säuren erzeugen und in der Industrie, wie beispielsweise Nahrungsmittelindustrie oder dgl. breite Anwendung finden, sind bekannt. Allerdings gibt es Nachteile beim Einsatz der Produktion organischer Säuren unter Verwendung industrieller Bakterien, wie beispielsweise *E. coli*, im großtechnischen Maßstab in der chemischen Industrie, wie beispielsweise der 3-HP-Produktion. Wenn die Menge der Produktion organischer Säure erhöht wird, nimmt die hydrierte Form der Säure zu und die Azidität wird erhöht (der pH-Wert nimmt ab), wodurch sich die Aktivität des größten Teils der *E. coli* verringert. In dem Fall der Herstellung organischer Säure bei hoher Konzentration erfordern die Bakterien eine Base, wie beispielsweise Natriumhydroxid (NaOH) und Ammoniumhydroxid (NH₄OH), um einen neutralen pH-Wert aufrechtzuerhalten. Dieses bewirkt in Abhängigkeit von der eingespritzten Base eine Zunahme der Kosten des Fermentationsprozesses und macht einen Prozess der Extraktion und Abtrennung schwierig oder erhöht signifikant die Kosten.

[0004] In einem neueren Fall eines Einsatzes der Produktion organischer Säure in der chemischen Industrie wird eine organische Säure unter Verwendung von Hefe aus Glucose erzeugt. Im Vergleich zu Bakterien verfügt Hefe über eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber einer organischen Säure, so dass die Aktivität der Hefe selbst bei hoher Azidität (geringer pH-Wert) nicht signifikant verringert wird, was die Hefe zur Herstellung der organischen Säure zu einem besser geeigneten Wirt macht. Insbesondere hat Hefe konventionell als industrieller Biokatalysator für die Herstellung von Sprit, technischem Alkohol oder dgl. breite Anwendung gefunden und lässt sich in Massenkultur kultivieren und kann nicht mit Bakteriophagen kontaminiert werden, so dass die Einsetzbarkeit der Hefe in der chemischen Industrie gegenüber Bakterien weit überlegen ist. Bei der Herstellung einer organischen Säure hat Hefe Vorteile, allerdings gibt es auch bei der Verwendung der Hefe zur Herstellung einer organischen Säure wie 3-HP mehrere Nachteile. Erstens, ist es im Vergleich zu Bakterien schwieriger Hefe genetisch zu modifizieren, und um ein spezielles metabolisches Enzym zu exprimieren, müsste der subzelluläre Ort für die Exprimierung des Stoffwechselweges zusammen mit dem speziellen metabolischen Enzym identifiziert werden, was anders als bei Bakterien auf die Form der Zellen zurückzuführen ist, die in intrazelluläre strukturelle Körper geteilt werden, wie beispielsweise Mitochondrien, Peroxisomen oder dergleichen. Beispielsweise wird ein repräsentatives Stoffwechselzwischenprodukt, wie beispielsweise Acetyl-CoA in Hefen hauptsächlich in den Mitochondrien erzeugt. Wenn allerdings ein Zielprodukt in dem Cytosol erzeugt wird, ist ein Verfahren zum Herstellen von Acetyl-CoA in dem Cytosol ebenfalls erforderlich. Da es darüber hinaus im Bereich der Pilze eine große Zahl unterschiedlicher Hefen gibt und nicht alle Hefen der Anforderung hoher Produktivität, Widerstandsfähigkeit gegen organischen Säuren und

Massenkultur gerecht werden, ist effektiv ein Wirt zu wählen, der zum Herstellen der organischen Säuren geeignet ist.

[0005] Es ist bekannt, dass einige Hefen wirkungsvoll Ethanol aus Glucose erzeugen, bei der es sich um eine Hexose handelt, und einige Hefearten erzeugen auch eine organische Säure. Zum Zeitpunkt der Modifikation beim Herstellen eines Zielprodukts unter Verwendung von Mikroorganismen kommt es darauf an, bei einer Stoffwechselreaktion ein Gesamtgleichgewicht von Oxidation und Reduktion aufrechtzuerhalten, wobei geeigneter Weise auch eine Stoffwechselreaktion des Fermentierens von Ethanol aus Glucose eine aufrecht-erhaltene Reaktion ist. Selbst im Fall der genetischen Modifizierung von Hefe zum Erzeugen einer organischen Säure sollte das vorstehend beschriebene Gleichgewicht geeigneter Weise eingehalten werden, während in einem Fall des Herstellens von Milchsäure durch Modifikation von Hefe die ausgewogene Einführung von Milchsäure-Dehydrogenase (LDH) einer anderen Reduktionsreaktion zum Komplementieren einer Reduktionsreaktion zum Herstellen von Ethanol aus Acetaldehyd von Bedeutung ist.

[0006] Es ist bekannt, dass in einer kleinen Zahl von Mikroorganismen, wie beispielsweise *Chloroflexus aurantiacus*, eine kleine Menge 3-HP erzeugt wird und 3-HP teilweise aus einem Zersetzungsprozess von Dimethylsulfoniopropionat in Mikroorganismen gebildet wird, wie beispielsweise *Alcaligenes faecalis*, oder einem Zersetzungsprozess von Uracil in Hefe. Durch die Entdeckung des in der Natur vorhandenen 3-HP, wie vorstehend beschrieben, ist Forschung nach 3-HP-Stoffwechselwegen und entsprechenden Enzymen ausgeführt worden und auf der Grundlage der Forschung neuerlich nach einer Technologie zum Herstellen von 3-HP oder einer PHA, die Polymer von 3-HP ist, ausgeführt worden, indem ein für die 3-HP-Biosynthese in *E. coli* erforderliches Gen eingeführt wurde. Um darüber hinaus die Produktivität und die Produktionsausbeute an 3-HP zu maximieren, die lediglich als ein Stoffwechselzwischenprodukt vorliegt oder lediglich in geringen Mengen in der Natur produziert wird, mussten Technologien zum Einsatz gelangen, wie beispielsweise eine Technologie des Stoffwechsel-Engineerings, eine Technologie der Systembiologie, eine Technologie der synthetischen Biologie oder dergleichen.

[0007] Im Rahmen der Entwicklung der Technologie des Stoffwechsel-Engineerings ist es möglich geworden, die Produktions-Stoffwechselwege verschiedener Materialien unter Verwendung von Mikroorganismen vorherzusagen, wobei sich ein Stoffwechselweg zur Herstellung von 3-HP aus Glucose ja nach den Stoffwechselzwischenprodukten grob unterteilen lässt in einen Acryloyl-CoA-Stoffwechselweg, einen β -Alanin-Stoffwechselweg, einen Malonyl-CoA-Stoffwechselweg und einen Glycerol-Stoffwechselweg.

[0008] Der Acryloyl-CoA-Stoffwechselweg bedeutet ein Stoffwechselweg der Umwandlung von Pyruvat oder Phosphoenolpyruvat (PEP), das aus der Glykolyse von Glucose erhalten wird, zu Acryloyl-CoA über Lactat oder β -Alanin, und dann Umwandeln des Acryloyl-CoA zu 3-HP durch eine Hydratationsreaktion und eine Reduktionsreaktion (Pyruvat oder PEP $\rightarrow$ Lactat oder β -Alanin $\rightarrow$ Acryloyl-CoA $\rightarrow$ 3-HP). Acryloyl-CoA ist ein Stoffwechselprodukt, das während des Zersetzungsprozesses von Propionsäure beobachtet wird, und da der Wert für die Gibbs'sche Freie Energie für die Bildung des Stoffwechselprodukts positiv ist, ist eine Hinreaktion eine ungünstige Reaktion. Darüber hinaus ist die Substratspezifität von Acryloyl-CoA-Thioesterasen gering, so dass der Acryloyl-CoA-Stoffwechselweg als Stoffwechselweg für die Massenherstellung von 3-HP nicht geeignet ist.

[0009] Der β -Alanin-Stoffwechselweg bedeutet ein Stoffwechselweg des Umwandelns von Pyruvat oder Oxaloacetat zu Aminosäure mit Hilfe einer Transaminierungsreaktion und abschließende Umwandlung in 3-HP über β -Alanin durch eine Transaminierungsreaktion (Pyruvat oder Oxaloacetat $\rightarrow$ Aminosäure $\rightarrow$ β -Alanin $\rightarrow$ 3-HP; US 2012/0135481A1). Da die Transaminierungsreaktion von β -Alanin zu 3-HP über Malonat-Semialdehyd abläuft, das für Mikroorganismen stark toxisch ist, wird eine 3-HP-Dehydrogenase benötigt, die über eine hohe Aktivität verfügt. Da die Transaminierungsreaktion darüber hinaus generell eine Radikalform einer Aminosäure-Molekularstruktur in einem stationären Zustand erzeugt, hat ein Enzym dieser Reaktion eine Struktur zur Milderung des Reaktionsvermögens des Radikals. Da dieses Radikal über ein starkes Reaktionsvermögen mit Sauerstoff verfügt, werden im Wesentlichen für eine glatte Transaminierungsreaktion anaerobe Bedingungen oder ein Coenzym zum Stabilisieren der Radikalmoleküle benötigt.

[0010] Der Malonyl-CoA-Stoffwechselweg ist ein Stoffwechselweg der Umwandlung von Acetyl-CoA in Malonyl-CoA durch Carboxylierung und anschließende Umwandlung von Malonyl-CoA in 3-HP durch eine Reduktionsreaktion (Acetyl-CoA $\rightarrow$ Malonyl-CoA $\rightarrow$ 3-HP), wobei der Glycerol-Weg ein Stoffwechselweg der Umwandlung von Glucose in Glycerol ist, Umwandlung von Glycerol zu 3-Hydroxypropionaldehyd durch eine Reaktion der Dehydratisierung, und anschließend Umwandlung von 3-Hydroxypropionaldehyd zu 3-HP (Glucose $\rightarrow$ Glycerol $\rightarrow$ 3-Hydroxypropionaldehyd $\rightarrow$ 3-HP). Da der Malonyl-CoA-Stoffwechselweg und der Gly-

cerol-Stoffwechselweg über ein Zwischenprodukt ablaufen, das im Allgemeinen durch Mikroorganismen wie *E. coli* oder dgl. erzeugt wird, sind überwiegend diese Stoffwechselwege als die Wege für die 3-HP-Produktion untersucht worden (US 2013/0071893 A1). Da Malonyl-CoA in 3-HP durch Malonat-Reduktase und 3-HP-Dehydrogenase umgewandelt werden kann, und Glycerol zu 3-HP durch Glycerol-Dehydratase und Aldehyd-Dehydrogenase umgewandelt werden kann, war ein Verfahren zum Umwandeln von Glucose oder Glycerol in 3-HP unter Verwendung von modifizierten *E. coli* gut bekannt. Eine Dehydratationsreaktion von Glycerol, bei der es sich um eine Reaktion handelt, die ähnlich der Transaminierungsreaktion von Radikalen begleitet wird, erfordert im Wesentlichen Coenzym B12 zur Ausführung der Reaktion in Gegenwart von Sauerstoff.

[0011] Hinsichtlich der industriellen Fermentation sind der β -Alanin-Stoffwechselweg oder der Glycerol-Stoffwechselweg als Stoffwechselweg für die Erzeugung von 3-HP unter Verwendung von Hefe nicht geeignet, da es schwierig ist, ein Coenzym, wie beispielsweise Coenzym B12, als ein Material für ein Kulturmedium auf Grund seiner Kosten zu verwenden, und Bioorganismen wie Hefe das entsprechende Material nicht in Zellen biosynthetisieren oder absorbieren können. Neuerlich sind Untersuchungen zum Modifizieren der Schlüsselenzyme zur Überwindung dieses Problems veröffentlicht worden [US 7,655,451 B2].

[0012] Malonyl-CoA wird aus Acetyl-CoA in dem Cytosol synthetisiert und kann dadurch zu 3-HP reduziert werden. In dem Fall von Bakterien wie *E. coli* wird in dem Cytosol aus Pyruvat Acetyl-CoA erzeugt und kann dadurch als ein Substrat des TCA-Zyklus oder anderer Stoffwechselreaktion verwendet werden. Allerdings wird, wie vorstehend beschrieben wurde, in Hefe mit unabhängigen subzellulären Kompartimenten im Allgemeinen Acetyl-CoA in den Mitochondrien synthetisiert und als ein Substrat des TCA-Zyklus verwendet, wobei Acetyl-CoA in dem Cytosol über Acetat erzeugende Reaktion erzeugt wird, die eine Nebenreaktion einer Reaktion der Ethanol-Erzeugung oder einer Reaktion des Zitronensäurekreislaufs ist. Alle Reaktionen der Erzeugung von Acetyl-CoA aus Acetat oder Citronensäure sind Reaktionen, die ATP verbrauchen, und da Hefe außerdem Energie verbraucht, um Acetyl-CoA in Cytosol gegenüber Bakterien zu erhalten, kann hinsichtlich der Energetik Hefe von Nachteil sein.

[0013] In Hefe sind Umgebungen, wie beispielsweise Reduktionszustand des Cytosols, Faltung nach der Proteinsynthese, Codon-Nutzung und dgl., im Vergleich zu denen in Bakterien verschieden, so dass zum Zeitpunkt des Exprimierens eines von Bakterien abgeleiteten exogenen Enzyms eine Aktivität davon nicht gezeigt werden kann oder die Aktivität signifikant herabgesetzt sein kann. Da darüber hinaus die Aktivität infolge Gegenwart oder Abwesenheit von Sauerstoff oder anderen Metallionen signifikant geändert sein kann, können selbst in dem Fall exogener Enzyme, die die gleichen Funktionen haben, Ergebnisse der Expression davon in Hefe entsprechend der Herkunft der Enzyme verschieden sein. In dem Fall von Xylose-Isomerase (XI), die ein wichtiges Enzym des Xylose-Stoffwechsels ist, war zum Zeitpunkt des Exprimierens von XI, deriviert von Bakterien in Hefe, eine Aktivität davon größtenteils signifikant niedrig, jedoch ist gezeigt worden, dass Hefe erfolgreich modifiziert wurde, um so Xylose-Stoffwechsel bei relativ hoher Aktivität durch Einführen von XI, die von anaerobem Pilz deriviert wurde, auszuführen. So sollte im Fall der Einföhrung eines von Bakterien oder Archaeen derivierten Stoffwechselwegs, wie beispielsweise der Malonyl-CoA-Stoffwechselweg in Hefe, ein über hohe Aktivität verfügendes Gen durch Gene gesichert werden, die die gleichen Funktionen mit unterschiedlicher Herkunft ausführen.

[0014] Im Zusammenhang mit einem Verfahren zum genetischen Modifizieren von *Saccharomyces cerevisiae* unter verschiedenen Hefestämmen zur Erzeugung von 3-HP gibt es zahlreiche Veröffentlichungen und Patente, doch gibt es im Fall von *Saccharomyces cerevisiae*, da 3-HP über den [Pyruvinsäure $\rightarrow$ Acetaldehyd $\rightarrow$ Essigsäure $\rightarrow$ Acetyl-CoA $\rightarrow$ Malonyl-CoA $\rightarrow$ Malonat-Semialdehyd $\rightarrow$ 3-HP]-Stoffwechselweg erzeugt wird, Probleme insofern, dass dieser Stoffwechselweg zur Erzeugung von 3-HP kompliziert ist und die Produktivität von 3-HP relativ gering ist (US 2010/0248233A1; Y. Chen et al., *Metabolic Engineering*, 22:104-109, 2014).

[0015] Als Ergebnis des Versuchs zur Lösung der vorgenannten Probleme haben die Erfinder der vorliegenden Erfindung, um die Nachteile von Hefe zu überwinden, wo ATP in einem Prozess zur Erlangung von Acetyl-CoA in Cytosol verbraucht wird, einen kürzeren Stoffwechselweg von [Pyruvat $\rightarrow$ Acetaldehyd $\rightarrow$ Acetyl-CoA $\rightarrow$ Malonyl-CoA $\rightarrow$ Malonat-Semialdehyd $\rightarrow$ 3-HP] gefunden, der Acetaldehyd direkt in Acetyl-CoA umwandelt, ohne ein Acetat-Zwischenprodukt zu durchlaufen, und haben bestätigt, dass in dem Fall der Verwendung einer diesen Stoffwechselweg umfassenden rekombinanten Hefe anders als im Fall der Verwendung von *E. coli* die Verwendung von Materialien zur pH-Werteinstellung nicht nur verringert und dadurch die Erzeugung von Salzen herabgesetzt wird, sondern 3-HP auch aus Biomasse mit einer hohen Konzentration

und einer hohen Ausbeute selbst bei niedrigem pH-Wert erzeugt werden kann, womit die vorliegende Erfindung vervollständigt wurde.

Kurzbeschreibung der Erfindung

[0016] Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung einer einen aktiven biosynthetischen 3-HP-Stoffwechselweg von [Pyruvat → Acetaldehyd → Acetyl-CoA → Malonyl-CoA → Malonat-Semialdehyd → 3-HP] umfassende rekombinanten Hefe, der Acetaldehyd direkt und nicht über Acetat zu Acetyl-CoA umwandelt.

[0017] Eine andere Aufgabe der Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zum Herstellen von 3-HP unter Verwendung der rekombinanten Hefe.

Lösung der Aufgabe

[0018] Um die vorgenannten Ziele zu erreichen, gewährt die vorliegende Erfindung eine rekombinante Hefe, umfassend einen aktiven Stoffwechselweg zur Biosynthese von 3-HP von [Pyruvat → Acetaldehyd → Acetyl-CoA → Malonyl-CoA → Malonat-Semialdehyd → 3-HP], wobei die Hefe umfasst: ein exogenes Gen, das für AADH kodiert; ein endo- oder exogenes Gen, das für ACC kodiert; ein exogenes Gen, das für MCR kodiert, und ein exogenes Gen, das für HPDH kodiert.

[0019] In der vorliegenden Erfindung ist die Hefe säurebeständig und ausgewählt beispielsweise aus der Gruppe bestehend aus den Genera *Saccharomyces*, *Kazachstania* und *Candida*. Hefe-Spezies von besonderem Interesse schliessen ein: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kazachstania exigua*, *Kazachstania bulderi* und *Candida humilis*, wobei die Spezies auf diese allein nicht beschränkt sind.

[0020] Darüber hinaus gewährt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Herstellen von 3-HP, umfassend: (a) Kultivieren der rekombinanten Hefe nach einem der Ansprüche 1 bis 10 in einem Medium, das mindestens eine Kohlenstoffquelle einschließt, wodurch 3-HP erzeugt wird; und (b) Isolieren von 3-HP aus der Kultur.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Fig. 1 zeigt einen Stoffwechselweg zum Herstellen von 3-HP aus Glucose aus der rekombinanten Hefe der vorliegenden Erfindung (modifizierter Malonyl-CoA-Stoffwechselweg) und wichtiger Enzyme.

Fig. 2 zeigt ein relatives Ranking der ACCI-Aktivität von Acetyl-CoA-Carboxylase-Enzymen.

Fig. 3 zeigt Ergebnisse, die die relative Aktivität (links) und Expressionsstärken (SDS-PAGE) (rechts) der Archaeen-MCR-Varianten bestätigen.

Fig. 4 zeigt Hefe-Expressionsplasmide pSK-84 und pSK-85 für exprimierende Enzyme in Verbindung mit dem 3-HP-Stoffwechselweg.

Fig. 5 zeigt Ergebnisse des Testens der Kultivierungsbedingungen, die auf die Produktionsmengen von 3-HP einwirken könnten.

Fig. 6 zeigt 3-HP-Produktion mit einem besser etablierten 3-HP-Produktionsstamm unter Verwendung von Fed-batch (Tablet-spiking)-Bedingungen der Kultivierung.

Beschreibung der Erfindung

[0021] Sofern nicht anders festgelegt, haben alle hierin verwendeten technischen und wissenschaftlichen Begriffe die gleichen Bedeutungen, wie sie dem Fachmann auf dem Gebiet, auf das sich die vorliegende Erfindung bezieht, selbstverständlich sind. Im Allgemeinen ist die hierin verwendete Nomenklatur gut bekannt und wird üblicherweise auf dem Gebiet eingesetzt.

[0022] Im Allgemeinen wird ATP in Hefe in dem Verfahren zum Herstellen von Acetyl-CoA durch Umwandlung in AMP verbraucht, da Acetyl-CoA auf dem Stoffwechselweg von [Acetaldehyd → Acetat → Acetyl-CoA] hergestellt wird, und Acetat in Cytosol von Hefe erzeugt wird (**Fig. 1**; Y. Chen et al., *Metabolic Engineering*, 22:104-109, 2014).

[0023] In der vorliegenden Erfindung wird jedoch ein Stoffwechselweg konzipiert und angewendet, bei dem die Nachteile von ATP verbrauchender Hefe durch direktes Herstellen von Acetyl-CoA in Cytosol (**Fig. 1**) aus Acetaldehyd und nicht über Acetat in dem Verfahren zum Erzeugen von Acetyl-CoA in Cytosol (**Fig. 1**) überwunden und verbessert wurden. Als Ergebnis wurde in dem Fall der Verwendung rekombinanter Hefe der vorliegenden Erfindung gezeigt, dass 3-HP in einer hohen Konzentration und einer hohen Ausbeute aus Glucose selbst bei einem niedrigen pH-Wert erzeugt wird.

[0024] Daher richtet sich die vorliegende Erfindung in einem Aspekt auf eine rekombinante Hefe, die einen aktiven biosynthetischen 3-HP-Stoffwechselweg von [Pyruvat → Acetaldehyd → Acetyl-CoA → Malonyl-CoA → Malonat-Semialdehyd → 3-HP] umfasst, wobei die Hefe umfasst: ein exogenes Gen, das für AADH kodiert; ein endo- oder exogenes Gen, das für ACC kodiert; ein exogenes Gen, das für MCR kodiert und ein exogenes Gen, das für HPDH kodiert.

[0025] Der biosynthetische 3-HP-Stoffwechselweg von [Pyruvat → Acetaldehyd → Acetyl-CoA → Malonyl-CoA → Malonat-Semialdehyd → 3-HP] ist ein Weg zum Erzeugen von 3-HP aus einer Kohlenstoffquelle, wie beispielsweise Glucose usw.: (i) „Pyruvat → Acetaldehyd“ bedeutet einen Stoffwechselweg zum Erzeugen von Acetaldehyd aus Pyruvat unter Verwendung von Pyruvat-Decarboxylase (PDC) ohne Erzeugung eines Zwischenprodukts; (ii) „Acetaldehyd → Acetyl-CoA“ bedeutet einen Stoffwechselweg zum Erzeugen von Acetyl-CoA aus Acetaldehyd unter Verwendung von acetylierender Acetaldehyd-Dehydrogenase (AADH) ohne Erzeugung eines Zwischenprodukts, wie beispielsweise Acetat; (iii) „Acetyl-CoA → Malonyl-CoA“ bedeutet einen Stoffwechselweg zum Erzeugen von Malonyl-CoA aus Acetyl-CoA unter Verwendung von Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) ohne Erzeugung eines Zwischenprodukts; (iv) „Malonyl-CoA → 3-HP“ oder „Malonyl-CoA → Malonat-Semialdehyd → 3-HP“ bedeutet einen Stoffwechselweg zum Erzeugen von 3-HP aus Malonyl-CoA unter Verwendung von bifunktionaler Malonyl-CoA-Reduktase (MCR) ohne Erzeugung eines Zwischenprodukts oder einen Stoffwechselweg zum Erzeugen von 3-HP aus Malonat-Semialdehyd durch Biosynthese von Malonat-Semialdehyd unter Verwendung von monofunktionaler Malonyl-CoA-Reduktase (**Fig. 1**).

[0026] In der vorliegenden Erfindung ist das PDC-Gen keinem Engineering unterzogen, wobei jedoch ein Engineering des PDC-Gens zu Erhöhung der 3-HP-Produktionsrate, beispielsweise durch Amplifizieren des in der Hefe vorhandenen PDC-Gens vorgenommen werden kann, indem auf dem Gebiet der wohl bekannte Stand der Technik angewendet wird.

[0027] In einer beispielhaften Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden Stoffwechselwegenzyme kodierende Gene, die über eine spezifische Funktion verfügen, extrahiert durch Bioinformatik-Genom Mining von Stoffwechselenzym-Kandidaten.

[0028] Die vorliegende Erfindung umfasst ein für AADH kodierendes exogenes Gen. In einer Ausführungsform ist das für AADH kodierende Gen eine für AADH kodierende Aminosäuresequenz mit mindestens 60%, bevorzugt mindestens 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 99% oder 100% Sequenzidentität zu einer AADH-Aminosäuresequenz, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Aminosäuresequenzen, die nachfolgend in den Tabellen 1 bis 3 dargestellt sind, ohne jedoch auf diese beschränkt zu sein, solange sie über eine Funktion der Biosynthese von Acetyl-CoA aus Acetaldehyd verfügen.

[Tabelle 1] AADH (Typ adhE)

Gen	GenBank Accession-Nr. (Aminosäuresequenzen)	GI-Nr.	Organismus	Abkürzung
adhE (SEQ ID NO: 145)	NP_415757.1	16129202	<i>Escherichia coli</i> K-12 substr. MG1655	ADHEec
adhE (SEQ ID NO: 146)	AY282576.1	33578054	<i>Piromyces</i> sp. E2	ADHEpm
adhE (SEQ ID NO: 147)	NP_370672.1	15923138	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus Mu50	ADHEsa
P343_14875 (SEQ ID NO: 148)	EST10864.1	558501608	<i>Sporolactobacillus laevolacticus</i> DSM 442	ADHEsl

Gen	GenBank Accession-Nr. (Aminosäuresequenzen)	GI-Nr.	Organismus	Abkürzung
UCRPA7_2908 (SEQ ID NO: 149)	EOO01596.1	500258690	<i>Togninia minima</i> UCRPA7	ADHEtm
(SEQ ID NO: 150)	WP_020582522	522071313	<i>Endozoicomonas elysicola</i>	ADHEee
RW 1 006 000 90 (SEQ ID NO: 151)	GAF43117.1	589262551	<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> NBRC 100605	ADHErw

[Tabelle 2] AADH (Typ eutE)

Gen	GenBank Accession-Nr. (Aminosäuresequenzen)	GI-Nr.	Organismus	Abkürzung
eutE (SEQ ID NO: 152)	Y-P_001459232.1	157161914	<i>Escherichia coli</i> HS	EUTEec
(SEQ ID NO: 153)	Y-P_003003316.1	251788595	<i>Dickeya zeae</i> Ech1591	EUTEdz
(SEQ ID NO: 154)	NP_470466.1	16800198	<i>Listeria innocua</i> Clip11262	LIN1129li
C790_00285 (SEQ ID NO: 155)	EMP53767.1	468911480	<i>Morganella morganii</i> SC01	AADHmm
C666_02610 (SEQ ID NO: 156)	ENO90114.1	479302014	<i>Thauera linaloolentis</i> DSM 12138	AADHtl
(SEQ ID NO: 157)	W-P_018205006.1	516997301	<i>Atribacteria bacterium</i> SCGC AAA252-M02	AADHab
Maqu_1235 (SEQ ID NO: 158)	ABM18325.1	120324010	<i>Marinobacter aquaeolei</i> VT8	AADHmal
CLS_23700 (SEQ ID NO: 159)	CBK77783.1	295091676	<i>Clostridium cf. saccharolyticum</i> K10	AADHcs
Plabr_4078 (SEQ ID NO: 160)	ADY61655.1	324970877	<i>Planctomyces brasiliensis</i> DSM 5305	AADHpb
GCWU000342_00651 (SEQ ID NO: 161)	EEP29295.1	229793181	<i>Shuttleworthia satellites</i> DSM 14600	AADHss
Tola_1697 (SEQ ID NO: 162)	ACQ93307.1	237500714	<i>Tolomonas auensis</i> DSM 9187	AADHta
HMPREF9024_01049 (SEQ ID NO: 163)	EFA26759.1	270280925	<i>Pediococcus acidilactici</i> 7_4	AADHpa
BN552_01640 (SEQ ID NO: 164)	CDB76812.1	524431109	<i>Blautia</i> sp. CAG:237	AADHbs
HMPREF0179_00640 (SEQ ID NO: 165)	EFV45545.1	316924378	<i>Bilophila wadsworthia</i> 3_1_6	AADHbw
Mahau_0819 (SEQ ID NO: 166)	AEE96017.1	332699076	<i>Mahella australiensis</i> 50-1 BON	AADHma2

Gen	GenBank Accession-Nr. (Aminosäurese- quenzen)	GI-Nr.	Organismus	Abkürzung
ALO_06783 (SEQ ID NO: 167)	EGO64744.1	337276312	<i>Acetonea longum DSM 6540</i>	AADHal
HMPRE- F9200_0641 (SEQ ID NO: 168)	EGS34769.1	341591638	<i>Veillonella sp. oral taxon 780 str. F0422</i>	AADHvso
VEJY3_08440 (SEQ ID NO: 169)	AEX22176.1	369841032	<i>Vibrio sp. EJY3</i>	AADHvs
OpIT1D- RAFT_04559 (SEQ ID NO: 170)	EIQ00023.1	391221602	<i>Opitutaceae bacterium TAV1</i>	AADHob
HSACCH_00271 (SEQ ID NO: 171)	CCU77919.1	460789193	<i>Halanaerobium saccharolyticum DSM 6643</i>	AADHhs
Hoch 5813 (SEQ ID NO: 172)	ACY18289.1	262082320	<i>Haliangium ochraceum DSM 14365</i>	AADHho

[Tabelle 3] AADH

Gen	GenBank Accession-Nr. (Aminosäurese- quenzen)	GI-Nr.	Organismus	Abkürzung
sucD (SEQ ID NO: 173)	EEN82978.1	229317069	<i>Porphyromonas endodontalis ATCC 35406</i>	AADHpe
AZOBR_- p480045 (SEQ ID NO: 174)	CCD03730.1	356882712	<i>Azospirillum brasilense Sp245</i>	AADHabr
HMPRE- F1987_01259 (SEQ ID NO: 175)	ERJ82808.1	543978929	<i>Peptostreptococcaceae bacterium 113 str. W5053</i>	AADHpba
Terro_0974 (SEQ ID NO: 176)	AFL87295.1	390411791	<i>Terriglobus roseus DSM 18391</i>	AADHtr

[0029] Die vorliegende Erfindung umfasst ein Gen, das ACC kodiert. In einer Ausführungsform ist das Gen, das ACC kodiert, eine Nukleinsäure, die ACC kodiert, mit einer Aminosäuresequenz von mindestens 60 %, vorzugsweise mindestens 70 %, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 99% oder 100 % Sequenzidentität zu einer ACC-Aminosäuresequenz, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Aminosäuresequenzen, die in nachstehender Tabelle 4 dargestellt sind, aber nicht darauf beschränkt ist, sofern sie die Funktion der Biosynthese von Malonyl-CoA aus Acetyl-CoA hat.

[Tabelle 4] ACC (eukaryotischer Multidomärentyp)

Gen	GenBank Accession-Nr. (Aminosäurese- quenzen)	GI-Nr.	Organismus	Abkürzung
ACC1 (SEQ ID NO: 177)	CAA96294.1	1302498	<i>Saccharomyces cerevisiae S288c</i>	ACC1sc

Gen	GenBank Accession-Nr. (Aminosäurese- quenzen)	GI-Nr.	Organismus	Abkürzung
YALIOC11407g (SEQ ID NO: 178)	XP_501721.1	50548503	<i>Yarrowia lipolytica</i> CLIB122	ACC1y1
HMPREF1544_10 598 (SEQ ID NO: 179)	EPB82652.1	511001160	<i>Mucor circinelloides</i> f. <i>circinelloi-</i> des 1006PhL	ACC1mc
ACC1ke (SEQ ID NO: 102)			<i>Kazachstania exigua</i>	ACC1ke
ACC1ch (SEQ ID NO: 106)			<i>Candida humilis</i>	ACC1ch
CGB F3610C (SEQ ID NO: 180)	XP_003194770. 1	321260100	<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	ACC1cg
AGABI1DRAFT_ 70405 (SEQ ID NO: 181)	EKM81867.1	409081508	<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>burnettii</i> JB137-S8	ACC1ab
BATDEDRAFT_18 673 (SEQ ID NO: 182)	EGF84402.1	328774365	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> JAM81	ACC1bd
RHTO_02004 (SEQ ID NO: 183)	EMS21133.1	472583500	<i>Rhodospiridium toruloides</i> NP11	ACC1rt
PITG_18706 (SEQ ID NO: 184)	EEY68805.1	262110753	<i>Phytophthora infestans</i> T30-4	ACC1pi
TCM_034957 (SEQ ID NO: 185)	XP_007018852. 1	590598290	<i>Theobroma cacao</i>	ACC1tc
Ot01g03240 (SEQ ID NO: 186)	CAL50235.1	116000555	<i>Ostreococcus tauri</i>	ACC1ot
NGATSA_3002800 (SEQ ID NO: 187)	AFJ69228.1	387219039	<i>Nannochloropsis gaditana</i> CCMP526	ACC1ng
accA (SEQ ID NO: 188)	EAL63219.1	60465120	<i>Dictyostelium discoideum</i> AX4	ACC1dd
LOC101893358 (SEQ ID NO: 189)	XP_005182000. 1	557764587	<i>Musca domestica</i>	ACC1md
ACACA (SEQ ID NO: 190)	ABX09993.1	159895418	<i>Sus scrofa</i>	ACC1ss
(SEQ ID NO: 191)	Uniprot: H2YM65		<i>Ciona savignyi</i>	ACC1cs

[0030] Die vorliegende Erfindung umfasst ein Gen, das MCR kodiert. In einer Ausführungsform kann eine MCR dahingehend bifunktional sein, dass sie eine Funktion der Umwandlung von Malonyl-CoA zu Malonatsemialdehyd und eine Funktion der Umwandlung von Malonatsemialdehyd zu 3-HP hat; oder dahingehend monofunktional, dass sie eine Funktion der Umwandlung von Malonyl-CoA zu Malonatsemialdehyd hat.

[0031] In der vorliegenden Erfindung ist das Gen, das die bifunktionale MCR kodiert, eine Nukleinsäure, die MCR kodiert, mit einer Aminosäuresequenz von mindestens 60 %, vorzugsweise mindestens 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 99% oder 100% Sequenzidentität zu einer MCR-Aminosäuresequenz, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Aminosäuresequenzen, die in nachstehender Tabelle 5 dargestellt sind, aber nicht darauf beschränkt ist, sofern sie gleichzeitig die Funktion der Umwandlung von Malonyl-CoA zu Malonatsemialdehyd und die Funktion der Umwandlung von Malonatsemialdehyd zu 3-HP hat.

[Tabelle 5] MCR bifunktionaler Typ)

Gen	GenBank Accession-Nr. (Aminosäuresequenzen)	GI-Nr.	Organismus	Abkürzung
Mcr (SEQ ID NO: 192)	AAS20429.1	42561982	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	MCRca
Cagg_1256 (SEQ ID NO: 193)	ACL24164.1	219542426	<i>Chloroflexus aggregans</i> DSM 9485	MCRcag
OSCT_0547 (SEQ ID NO: 194)	EFO81531.1	308227877	<i>Oscillochloris trichoides</i> DG-6	MCRot
Rcas_2929 (SEQ ID NO: 195)	ABU58991.1	156234208	<i>Roseiflexus castenholzii</i> DSM 13941	MCRrc
OMB55_00007690 (SEQ ID NO: 196)	EHQ57048.1	374302864	<i>gamma proteobacterium</i> HIMB55	MCRgp
Cabther_B0159 (SEQ ID NO: 197)	AEP13163.1	347588634	<i>Chloracidobacterium thermophilum</i> B	MCRct
(SEQ ID NO: 198)	WP_022680613.1	550932202	<i>Sandarakinorhabdus limnophila</i>	MCRsl
(SEQ ID NO: 199)	WP_023839102.1	564013708	<i>Blastomonas</i> sp. CACIA14H2	MCRbs

[0032] In einer anderen Ausführungsform kann das MCR-Gen monofunktional mit der Funktion der Umwandlung von Malonyl-CoA zu Malonatsemialdehyd sein, ein Gen, das ein Enzym kodiert, das Malonatsemialdehyd zu 3-HP umwandelt, kann weiter eingeschlossen sein.

[0033] In der vorliegenden Erfindung ist das Gen, das monofunktionale MCR kodiert, eine Nukleinsäure, die MCR kodiert, mit einer Aminosäuresequenz von mindestens 60 %, vorzugsweise mindestens 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 99 % oder 100 % Sequenzidentität zu einer MCR-Aminosäuresequenz, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Aminosäuresequenzen, die in nachstehender Tabelle 6 dargestellt sind, aber nicht darauf beschränkt ist, sofern sie die Funktion der Umwandlung von Malonyl-CoA zu Malonatsemialdehyd hat.

[Tabelle 6] MCR

Gen	GenBank Accession-Nr. (Aminosäuresequenzen)	GI-Nr.	Organismus	Abkürzung
Msed_0709 (SEQ ID NO: 200)	ABP94884.1	145701742	<i>Metallosphaera sedula</i> DSM 5348	MCRms
mcr/scr (SEQ ID NO: 201)	BAB67276.1	15623288	<i>Sulfolobus tokodaii</i> DSM 16993	MCRst
(SEQ ID NO: 202)	WP_020198954.1	519043079	<i>Sulfolobales archaeon</i> Acd1	MCRsa1
SacRon12I_11780 (SEQ ID NO: 203)	AGE74568.1	449039143	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> Ron12/I	MCRsa2

Gen	GenBank Accession-Nr. (Aminosäuresequenzen)	GI-Nr.	Organismus	Abkürzung
SacRon12I_10705 (SEQ ID NO: 204)	AGE74357.1	449038932	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> Ron12/I	MCRsa3
(SEQ ID NO: 205)	BAJ50751.1	343485097	<i>Candidatus Caldiarchaeum subterraneum</i>	MCRcc
MetMK1_00028480 (SEQ ID NO: 206)	EHP68415.1	373523495	<i>Metallosphaera yellowstonensis</i> MK1	MCRmy
TREAZ_1307 (SEQ ID NO: 207)	AEF80380.1	333734431	<i>Treponema azotonutricium</i> ZAS-9	MCRta

[0034] In der vorliegenden Erfindung ist das Gen, das ein Enzym kodiert, das Malonatsemialdehyd zu 3-HP umwandeln kann, eine Nukleinsäure, die ein Enzym kodiert, mit einer Aminosäuresequenz von mindestens 60 %, vorzugsweise mindestens 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 99 % oder 100 % Sequenzidentität zu einer HPDH-, HIBADH-, HBDH- oder BDH-Aminosäuresequenz, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Aminosäuresequenzen, die in den nachstehenden Tabellen 7-10 dargestellt sind, aber nicht darauf beschränkt ist, sofern das Gen, das das Protein kodiert, die Funktion der Biosynthese von 3-HP aus Malonatsemialdehyd hat.

[0035] Die in nachstehender Tabelle 7 dargestellten HPDH-Aminosäuresequenzen, in nachstehender Tabelle 8 dargestellten HIBADH-Aminosäuresequenzen, in nachstehender Tabelle 9 dargestellten HBDH-Aminosäuresequenzen und in nachstehender Tabelle 10 dargestellten BDH-Aminosäuresequenzen sind Aminosäuresequenzen eines Proteins, das die Funktion der Biosynthese von 3-HP aus Malonatsemialdehyd hat.

[Tabelle 7] HPDH

Gen	GenBank Accession-Nr. (Aminosäuresequenzen)	GI-Nr.	Organismus	Abkürzung
EC3431_0375 (SEQ ID NO: 208)	EFV00080.1	315619553	<i>Escherichia coli</i> 3431	HPDHec
YMR226C (SEQ ID NO: 209)	DAA10125.1	285814230	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	HPDHsc
Msed 1993 (SEQ ID NO: 210)	ABP96133.1	145702991	<i>Metallosphaera sedula</i> DSM 5348	HPDHms
STK_15070 (SEQ ID NO: 211)	BAK54608.1	342306519	<i>Sulfolobus tokodaii</i> str. 7	HPDHst
BWG_0862 (SEQ ID NO: 212)	ACR64730.1	238862732	<i>Escherichia coli</i> BW2952	HPDHecb
ATEG_09041 (SEQ ID NO: 213)	XP_001217663.1	115436862	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624	HPDHat
(SEQ ID NO: 214)	YP_902607.1	118581357	<i>Pelobacter propionicus</i> DSM 2379	HPDHpp

Gen	GenBank Accession-Nr. (Aminosäuresequenzen)	GI-Nr.	Organismus	Abkürzung
Snov_0928 (SEQ ID NO: 215)	Y- P_003692871.1	298290932	<i>Starkeya novella</i> DSM 506	HPDHsn
(SEQ ID NO: 216)	Y- P_004145243.1	319785768	<i>Pseudoxanthomonas suwonensis</i> 11-1	HPDHps
(SEQ ID NO: 217)	W- P_002641751.1	488717875	<i>Simonsiella muelleri</i>	HPDHsm
(SEQ ID NO: 218)	W- P_006802623.1	493855747	<i>Helicobacter winthamensis</i>	HPDHhw
(SEQ ID NO: 219)	WP 007116408.1	494180330	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	HPDHea
(SEQ ID NO: 220)	W- P_018365922.1	517177104	<i>Streptococcus didelphis</i>	HPDHsd
(SEQ ID NO: 221)	W- P_019460509.1	518290301	<i>Roseomonas</i> sp. B5	HPDHrs
YDF1 (SEQ ID NO: 222)	EAZ63492.1	126213385	<i>Pichia stipitis</i> CBS 6054	HPDHpst
KAFR0B03360 (SEQ ID NO: 223)	CCF56633.1	372462351	<i>Kazachstania africana</i> CBS 2517	HPDHka
ydfG (SEQ ID NO: 224)	EGC72291.1	325160162	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> ATCC 33392	HPDHhp
K788_004913 (SEQ ID NO: 225)	ETY79751.1	575860535	<i>Burkholderia earibensis</i> MBA4	HPDHbc
AMED_69 (SEQ ID NO: 226)	ADJ48621.1	299798246	<i>Amycolatopsis mediterranei</i> U32	HPDHam
CFU_3402 (SEQ ID NO: 227)	AEK63226.1	340553851	<i>Collimonas fungivorans</i> Ter331	HPDHcf
Rahaq2_2300 (SEQ ID NO: 228)	AEX52155.1	371588425	<i>Rahnella aquatilis</i> ATCC 33071	HPDHra
LS215_1598 (SEQ ID NO: 229)	ACP35603.1	227456916	<i>Sulfolobus islandicus</i> L.S.2.15	HPDHsi
(SEQ ID NO: 230)	WP 003467297.1	489562770	<i>Xanthomonas translucens</i>	HPDHxt
(SEQ ID NO: 231)	WP 007747336.1	495021561	<i>Cronobacter dublinensis</i>	HPDHcd
(SEQ ID NO: 232)	W- P_021506918.1	545151592	<i>Pantoea dispersa</i>	HPDHpd
(SEQ ID NO: 233)	EHT00469.1	376387763	<i>Klebsiella oxytoca</i> 10-5245	HPDHko

Gen	GenBank Accession-Nr. (Aminosäuresequenzen)	GI-Nr.	Organismus	Abkürzung
(SEQ ID NO: 234)	ESM32057.1	555088912	<i>Enterobacter cloacae</i> BWH 31	HPDHecl

[Tabelle 8] HIBADH

Gen	GenBank Accession-Nr. (Aminosäuresequenzen)	GI-Nr.	Organismus	Abkürzung
mmsB (SEQ ID NO: 235)	ADR61938.1	313500572	<i>Pseudomonas putida</i> BIRD-1	HIBADHpp
PA3569 (SEQ ID NO: 236)	AAG06957.1	9949723	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	HIBADHpa
BC_4042 (SEQ ID NO: 237)	AAP10961.1	29897686	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	HIBADHbc
QWA_01835 (SEQ ID NO: 238)	EJC65559.1	393165510	<i>Alcaligenes faecalis</i> NCIB 8687	HIBADHaf
(SEQ ID NO: 239)	JI420577.1	327223309	<i>Lytechinus variegatus</i>	HIBADHlv
(SEQ ID NO: 240)	GAXL01007172.1	596424618	<i>Chyphotes mellipes</i>	HIBADHcm
POPTR_0001-s46990g (SEQ ID NO: 241)	XP_002300566.1	224061611	<i>Populus trichocarpa</i>	HIBADHpt
(SEQ ID NO: 242)	WP_007234036.1	494440757	marine gamma proteobacterium HTCC2080	HIBADHmgp
(SEQ ID NO: 243)	WP_009244364.1	496538096	<i>Clostridiales</i> sp.	HIBADHcs
(SEQ ID NO: 244)	WP_017931623.1	516543998	<i>Robiginitomaculum antarcticum</i>	HIBADHra
(SEQ ID NO: 245)	WP_018914915.1	517744707	<i>Thiomonas</i> sp. FB-6	HIBADHts
(SEQ ID NO: 246)	WP_022530055.1	548582704	<i>Lactobacillus shenzhenensis</i>	HIBADHls
ABAZ39_23055 (SEQ ID NO: 247)	EZQ03930.1	612167293	<i>Azospirillum brasilense</i>	HIBADHab
(SEQ ID NO: 248)	EMI09340.1	460132162	<i>Anoxybacillus</i> sp. DT3-1	HIBADHas
T458 21320 (SEQ ID NO: 249)	EST53365.1	558617142	<i>Brevibacillus panacihumi</i> W25	HIBADHbp
xccb100_3039 (SEQ ID NO: 250)	CAP52402.1	167734194	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	HIBADHxc

Gen	GenBank Accession-Nr. (Aminosäuresequenzen)	GI-Nr.	Organismus	Abkürzung
<i>Beenme03 3479</i> (SEQ ID NO: 251)	ACA92632.1	169818050	<i>Burkholderia cenocepacia</i> MC0-3	HIBADHbcm
<i>Hoch 3369</i> (SEQ ID NO: 252)	ACY15871.1	262079902	<i>Haliangium ochraceum</i> DSM 14365	HIBADHho
<i>mmsB</i> (SEQ ID NO: 253)	ADP96674.1	311693801	<i>Marinobacter adhaerens</i> HP15	HIBADHma
<i>ivdF</i> (SEQ ID NO: 254)	AAN54737.1	24347484	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	HIBADHso

[Tabelle 9] HBDH

Gen	GenBank Accession-Nr. (Aminosäuresequenzen)	GI-Nr.	Organismus	Abkürzung
<i>gbd</i> (SEQ ID NO: 255)	AAC41425.1	695279	<i>Cupriavidus necator</i>	HBDHcn
<i>4hbD</i> (SEQ ID NO: 256)	EDK35022.1	146348486	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	HBDHck
GO-S_1589287 (SEQ ID NO: 257)	EDB80735.1	142959799	<i>marine metagenome</i> sp.	HBDHmm
HMPRE-F0080_00276 (SEQ ID NO: 258)	EHM43401.1	364565684	<i>Anaeroglobus geminatus</i> F0357	HBDHag
BN605_01179 (SEQ ID NO: 259)	CDD07748.1	524585315	<i>Dorea</i> sp. CAG:317	HBDHds
BN791_01127 (SEQ ID NO: 260)	CDE92329.1	524795667	<i>Fusobacterium</i> sp. CAG:815	HBDHfs
<i>Odosp_2059</i> (SEQ ID NO: 261)	ADY33063.1	324312510	<i>Odoribacter splanchnicus</i> DSM 220712	HBDHos
<i>Bpro_2526</i> (SEQ ID NO: 262)	ABE44443.1	91697614	<i>Polaromonas</i> sp. JS666	HBDHps
<i>CsaI_1756</i> (SEQ ID NO: 263)	ABE59108.1	91796969	<i>Chromohalobacter salexigens</i> DSM 3043	HBDHcs
BRPE64_DC DS02300 (SEQ ID NO: 264)	BAN27166.1	506947049	<i>Burkholderia</i> sp. RPE64	HBDHbs

[Tabelle 10] BDH

Gen	GenBank Accession-Nr. (Aminosäuresequenzen)	GI-Nr.	Organismus	Abkürzung
bdhA (SEQ ID NO: 265)	GAA17557.1	346057674	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCMG1179	BDHpa
<i>Bresu 2563</i> (SEQ ID NO: 266)	YP 003819493.1	302383670	<i>Brevundimonas subvibrioides</i> ATCC 15264	BDHbs
(SEQ ID NO: 267)	YP 004110707.1	316935725	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> DX-1	BDHrp
(SEQ ID NO: 268)	WP 008960707.1	496247322	<i>Bradyrhizobium</i> sp. STM 3809	BDHbss
(SEQ ID NO: 269)	W-P_009158463.1	496449618	<i>Thalassobium</i> sp. R2A62	BDHts
(SEQ ID NO: 270)	WP 010548788.1	498234632	<i>gamma proteobacterium</i> HIMB30	BDHgp
(SEQ ID NO: 271)	WP 018183273.1	516955964	<i>Kaistia granuli</i>	BDHkg
h16_A1334 (SEQ ID NO: 272)	CAJ92474.1	113526129	<i>Ralstonia eutropha</i> H16	BDHre
bdhA (SEQ ID NO: 273)	EOY63580.1	509564889	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KP-7	BDHkp
AZOBR_p140023 (SEQ ID NO: 274)	CCD00057.1	356879155	<i>Azospirillum brasilense</i> Sp245	BDHab
bdhA (SEQ ID NO: 275)	ABF07432.1	93353343	<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	BDHcm

[0036] In einer speziellen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann die rekombinante Hefe, die einen aktiven Stoffwechselweg zur Biosynthese von 3-HP umfasst, die in Tabelle 11 aufgeführten Gene aufweisen, wie ein exogenes Gen, das AADH kodiert, mit einer Aminosäuresequenz, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 74 bis SEQ ID NO: 98, ein endogenes oder exogenes Gen, das ACC kodiert, mit einer Aminosäuresequenz, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 99 bis SEQ ID NO: 106, ein exogenes Gen, das MCR kodiert, mit einer Aminosäuresequenz, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 107 bis SEQ ID NO: 116, und ein exogenes Gen, das HPDH kodiert, mit einer Aminosäuresequenz, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 117 bis SEQ ID NO: 144.

[Tabelle 11]

Typ	Abkürzung des Gens	SEQ ID NR.
AADHs	AADHab	SEQ ID NO:74
	AADHal	SEQ ID NO:75
	AADHbs	SEQ ID NO: 76
	AADHbw	SEQ ID NO: 77
	AADHcs	SEQ ID NO:78
	AADHho	SEQ ID NO:79
	AADHhs	SEQ ID NO:80
	AADHmal	SEQ ID NO:81
	AADHma2	SEQ ID NO:82
	AADHmm	SEQ ID NO:83
	AADHpa	SEQ ID NO:84
	AADHpb	SEQ ID NO:85
	AADHpe	SEQ ID NO:86
	AADHrw	SEQ ID NO:87
	AADHsl	SEQ ID NO:88
	AADHss	SEQ ID NO:89
	AADHta	SEQ ID NO:90
	AADHtl	SEQ ID NO:91
	AADHtm	SEQ ID NO:92
	AADHvs	SEQ ID NO:93
	ADHEec	SEQ ID NO:94
	AHEpm	SEQ ID NO:95
	EUTEdz	SEQ ID NO:96
	EUTEec	SEQ ID NO:97
	LIN1129li	SEQ ID NO:98
ACC1s	ACC1sc_S659A	SEQ ID NO:99
	ACC1sc_S659A/S1157A	SEQ ID NO:100
	ACC1sc_S1157A	SEQ ID NO:101
	ACC1ke	SEQ ID NO:102
	ACC1mc	SEQ ID NO:103
	ACC1sc	SEQ ID NO:104
	ACCyl	SEQ ID NO:105
	ACC1ch	SEQ ID NO:106

Typ	Abkürzung des Gens	SEQ ID NR.
bifunktionale HPDH-MCRs	HPDH-MCRbs	SEQ ID NO:107
	HPDH-MCRca	SEQ ID NO:108
	HPDH-MCRcag	SEQ ID NO:109
	HPDH-MCRct	SEQ ID NO:110
	HPDH-MCRgb	SEQ ID NO:111
	HPDH-MCRot	SEQ ID NO:112
	HPDH-MCRrc	SEQ ID NO:113
	HPDH-MCRsl	SEQ ID NO:114
	HPDH-MCRca_variant_3	SEQ ID NO:115
	HPDH-MCRca_variant_6	SEQ ID NO:116
HPDHs	BDHcm	SEQ ID NO:117
	BDHkp	SEQ ID NO:118
	HBDHos	SEQ ID NO:119
	HBDHps	SEQ ID NO:120
	HIBADHas	SEQ ID NO:121
	HIBADHbc	SEQ ID NO:122
	HIBADHma	SEQ ID NO:123
	HIBADHpa	SEQ ID NO:124
	HIBADHxc	SEQ ID NO:125
	HPDHam	SEQ ID NO:126
	HPDHbs	SEQ ID NO:127
	HPDHca	SEQ ID NO:128
	HPDHcag	SEQ ID NO:129
	HPDHct	SEQ ID NO:130
	HPDHec	SEQ ID NO:131
	HPDHed	SEQ ID NO:132
	HPDHgb	SEQ ID NO:133
	HPDHhw	SEQ ID NO:134
	HPDHka	SEQ ID NO:135
	HPDHms	SEQ ID NO:136
	HPDHot	SEQ ID NO:137
	HPDHps	SEQ ID NO:138
	HPDHra	SEQ ID NO:139
	HPDHrc	SEQ ID NO:140
	HPDHsi	SEQ ID NO:141
	HPDHsl	SEQ ID NO:142
	HPDHsm	SEQ ID NO:143
	HPDHst	SEQ ID NO:144

[0037] In der vorliegenden Erfindung kann die Hefe säurebeständig sein, und die säurebeständige Hefe kann ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus beispielsweise den Gattungen *Saccharomyces*,

Kazachstania und Candida. Hefespezies von besonderem Interesse umfassen *Saccharomyces cerevisiae*, *Kazachstania exigua*, *Kazachstania bulderi* und *Candida humilis*, sind aber nicht darauf beschränkt.

[0038] Gemäß der vorliegenden Erfindung kann die rekombinante Hefe säurebeständig sein, und um die säurebeständige rekombinante Hefe herzustellen, wird vorzugsweise ein Hefewirt verwendet, der Säureresistenz gegen eine organische Säure (insbesondere 3-HP und/oder eine organische Säure, die als Nebenprodukt bei der Herstellung von 3-HP gebildet wird) aufweist.

[0039] Die säurebeständige Hefe kann ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus *Saccharomyces cerevisiae*, *Kazachstania exigua*, *Kazachstania bulderi* und *Candida humilis*, ist aber nicht darauf beschränkt.

[0040] Der in der Patentschrift verwendete Begriff „säurebeständige Hefe“ bezieht sich auf Hefe, die Säureresistenz gegen organische Säuren wie 3-HP oder dergleichen aufweist, und die Säureresistenz kann durch Bestätigung des Wachstums in einem Medium, das verschiedene Konzentrationen an organischer Säure enthält, bewertet werden. In diesem Fall kann „säurebeständige Hefe“ Hefe sein, die eine hohe Wachstumsrate und Biomasseverbrauchsrate bei Züchtung in einem Medium mit hohen Konzentrationen an organischer Säure, im Vergleich zu gewöhnlicher Hefe, aufweist.

[0041] Säurebeständige Hefe, gemäß der vorliegenden Erfindung, kann Hefe sein, die mindestens 10 % der Glucoseverbrauchsrate (oder dergleichen) oder mindestens 10 % der spezifischen Wachstumsrate in dem Medium, das über 1 M oder mehr organische Säure (insbesondere 3-HP) enthält, unter einem pH-Wert, der kleiner als der pKa-Wert der organischen Säure (insbesondere 3-HP) ist, im Vergleich zu Hefe, die in dem Medium gewachsen ist, das keine organische Säure enthält, aufrechterhalten kann. Säurebeständige Hefe, gemäß der vorliegenden Erfindung, kann Hefe sein, die mindestens 10 % der Glucoseverbrauchsrate (oder dergleichen) oder mindestens 10 % der spezifischen Wachstumsrate unter pH 2-4, im Vergleich zu pH 7, aufrechterhalten kann.

[0042] Der erfindungsgemäße gentechnisch veränderte Mikroorganismus kann durch Einführen eines Gens in ein Chromosom eines Mikroorganismus oder Einbringen eines modifizierten Vektors in einen Mikroorganismus hergestellt werden.

[0043] Ein Wirt, wo die Effizienz des Einbringens von DNA hoch ist und die Effizienz der Expression eingebrachter DNA hoch ist, wird im Allgemeinen als der veränderte Mikroorganismus verwendet, und in einem Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung wird Hefe verwendet, aber nicht beschränkt darauf, kann jede Art von Mikroorganismus verwendet werden, sofern die anvisierte DNA ausreichend exprimiert wird.

[0044] Der veränderte Mikroorganismus kann durch ein Transformationsverfahren hergestellt werden. „Transformation“ bedeutet das Einbringen von DNA in einen Wirt; dadurch kann DNA, als Faktor eines Chromosoms oder durch Einfügen in ein Chromosom, vervielfältigt werden, was ein Phänomen ist, das eine genetische Veränderung künstlich bewirkt. Bei üblichen Transformationsverfahren gibt es Elektroporation, Essigsäure-Lithium-PEG-Verfahren und dergleichen.

[0045] Außerdem kann, in der vorliegenden Erfindung, ein allgemein bekanntes gentechnisches Verfahren als Verfahren zum Einbringen eines Gens in ein Chromosom eines Wirtsmikroorganismus verwendet werden, und beispielsweise, gibt es ein Verfahren, das Retrovirus-Vektor, Adenovirus-Vektor, Adeno-assoziiertes Virus als Vektor, Herpes-simplex-Virus-Vektor, Pockenvirus-Vektor, Lentivirus-Vektor, nichtviralen Vektor usw. nutzt. „Vektor“ bedeutet ein DNA-Konstrukt mit einer DNA-Sequenz, die mit einer geeigneten Kontrollsequenz funktionsfähig zu verknüpfen ist, das DNA in einem Wirt exprimieren kann, ist. Ein Vektor kann ein Plasmid, ein Phagenpartikel oder nur eine latente Genom-Einfügung sein. Wenn ein Vektor in einen geeigneten Wirt transformiert wird, kann er unabhängig von einem Wirtsgenom vervielfältigt werden oder funktionieren, oder in einigen Fällen, kann er in ein Genom selbst integriert werden. Ein Plasmid ist der Typ, der am meisten als Vektor verwendet wird.

[0046] Ein typischer Plasmid-Vektor, der für die Aufgabe verwendet werden kann, hat eine Struktur, umfassend (a) einen Replikationsstartpunkt, der ermöglicht, dass eine Replikation effektiv durchgeführt wird, damit Plasmid-Vektoren pro Wirtszelle enthalten sind, (b) ein antibiotikaresistentes Gen oder ein auxotrophes Markergen, das ermöglicht, dass eine mit einem Plasmid-Vektor transformierte Wirtszelle ausgewählt wird, und (c) eine Restriktionsstelle eines Restriktionsenzym, die mit einem Fremd-DNA-Fragment eingeführt werden kann. Selbst wenn keine geeignete Restriktionsstelle eines Restriktionsenzym vorhanden ist, können ein

Vektor und Fremd-DNA leicht ligiert werden, wenn der Linker oder der synthetische Oligonukleotid-Adapter gemäß einem allgemeinen Verfahren verwendet wird.

[0047] Eine Nukleinsäure ist „funktionsfähig verknüpft“, wenn sie mit einer funktionalen Beziehung zu anderen Nukleinsäuresequenzen angeordnet ist. Es können eine Gen- und Kontrollsequenz(en) sein, die in einem Prozess verknüpft sind, der die Genexpression ermöglicht, wenn ein geeignetes Molekül (zum Beispiel ein transkriptionsaktivierendes Protein) mit der/den Kontrollsequenz(en) verknüpft ist. Beispielsweise ist die DNA für eine Präsequenz oder einen Sekretionsleader mit der DNA für ein Polypeptid funktionsfähig verknüpft, wenn ein an der Sekretion eines Polypeptids beteiligtes Präprotein exprimiert wird; ist ein Promotor oder ein Verstärker mit einer Kodierungssequenz funktionsfähig verknüpft, wenn die Transkription einer Sequenz beeinflusst wird; ist eine Ribosomenbindungsdomäne mit einer Kodierungssequenz funktionsfähig verknüpft, wenn die Transkription einer Sequenz beeinflusst wird; oder ist eine Ribosomenbindungsdomäne mit einer Kodierungssequenz funktionsfähig verknüpft, wenn sie so angeordnet ist, dass sie leicht translatiert werden kann.

[0048] Allgemein bezieht sich „funktionsfähig verknüpft“ auf einen Kontakt einer verknüpften DNA-Sequenz, oder darauf, dass ein Kontakt zu dem Sekretionsleader hergestellt und dieser in dem Leitrahmen dargestellt wird. Jedoch ist der Verstärker zum Herstellen des Kontakts nicht erforderlich. Die Verknüpfung der Verstärkersequenz wird durch Ligierung an einer geeigneten Restriktionsenzymstelle vollzogen. Wenn die Domäne nicht dargestellt ist, wird ein synthetischer Oligonukleotid-Adapter oder Oligonukleotid-Linker gemäß einem allgemeinen Verfahren verwendet.

[0049] Es versteht sich selbstverständlich, dass all die Vektoren nicht in gleichem Maße wirken, um die DNA-Sequenzen gemäß der vorliegenden Erfindung zu exprimieren. Ebenso wirken all die Wirtszellen bei dem gleichen Expressionssystem nicht in gleichem Maße. Der Fachmann wird jedoch einen Vektor, eine Expressionskontrollsequenz und eine Wirtszelle entsprechend auswählen, ohne vom Rahmen der vorliegenden Erfindung abzuweichen und ohne übermäßiges Experimentieren. Beispielsweise muss bei der Auswahl eines Vektors eine Wirtszelle in Betracht gezogen werden. Das ist so, weil der Vektor darin repliziert werden soll. Auch die Replikationszahl und das Vermögen, die Anzahl der Replikationen eines Vektors und die Expression von anderen Proteinen, die durch den Vektor kodiert werden, zum Beispiel Antibiotika-Marker, zu steuern, sollten berücksichtigt werden.

[0050] In einer anderen Ausführungsform ist die vorliegende Erfindung auf ein Verfahren zur Herstellung von 3-HP gerichtet, umfassend: (a) Kultivieren der rekombinanten Hefe nach einem der Ansprüche 1 bis 10 in einem Medium, das mindestens eine Kohlenstoffquelle umfasst, wodurch 3-HP produziert wird; und (b) Isolieren von 3-HP aus der Kultur.

[0051] In der vorliegenden Erfindung kann die Kohlenstoffquelle eine oder mehrere, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Glucose, Xylose, Arabinose, Saccharose, Fructose, Galactose, Cellulose, Glucoseoligomeren und Glycerin, sein, ist aber nicht darauf beschränkt.

[0052] In der vorliegenden Erfindung wird das Kultivieren vorzugsweise unter einer Bedingung, dass Mikroorganismen wie *E. coli* nicht mehr aktiv sind (z. B. Metabolitbildung usw.), durchgeführt. In einer Ausführungsform wird das Kultivieren bei einem pH-Wert von 1,0 bis 6,5, vorzugsweise bei einem pH-Wert von 1,0 bis 6,0, stärker bevorzugt bei einem pH-Wert von 2,6 bis 4,0, durchgeführt, ist aber nicht darauf beschränkt.

Art der Erfindung

[0053] Nachstehend wird die vorliegende Erfindung unter Bezugnahme auf die folgenden Beispiele ausführlicher beschrieben. Jedoch werden die folgenden Beispiele als Beispiel, um Beschreibung und Umfang des technischen Wesens der vorliegenden Erfindung einfach zu erklären, bereitgestellt. Dementsprechend wird der Umfang der vorliegenden Erfindung nicht dadurch beschränkt oder davon geändert. Außerdem können verschiedene Modifizierungen und Veränderungen durch den Fachmann, den die vorliegende Erfindung betrifft, ausgehend von dieser Beschreibung vorgenommen werden.

Beispiel 1: Auswahl von Wirtshefestämmen anhand der Toleranz gegenüber 3-HP

[0054] Ein wesentliches Merkmal eines 3-HP-Produktionsorganismus ist die gute Toleranz gegenüber hohen Konzentrationen an 3-HP, was die Produktakkumulation während der Fermentation bei minimalem Verlust der Leistungsfähigkeit des Stamms ermöglicht. Eine umfangreiche, vielfältige Reihe von 718 Wildtyp-Hefe-

stämmen wurde gescreent, um jene Stämme zu identifizieren, die hohe Konzentrationen an 3-HP bei niedrigem pH-Wert tolerieren können und die unter diesen Bedingungen wachsen und Glucose verstoffwechseln können (Tabelle 12).

[0055] Eine Reihe von Wachstumsassays auf Basis von Agarplatten und Mikrotiterplatten mit flüssigem Medium wurde zunächst genutzt, um die gesamte Reihe von Stämmen auf Säuretoleranz zu screenen. Danach wurde eine Teilmenge der Stämme auf ihre Fähigkeit zum Tolerieren von hohen Mengen an 3-HP bei niedrigem pH-Wert in Kultivierungen im Schüttelkolben bewertet. Isoliert ist keines dieser Screening-Verfahren ein perfekter Indikator für die 3-HP-Toleranz in einem industriellen Umfeld, doch eine Kombination von vielen Verfahren bietet einen umfassenden und stabilen Weg zur Ermittlung aussichtsreicher 3-HP produzierender Hefestämme.

[0056] Zunächst wurde das Wachstum der 718 Hefestämme an festem YPD-Agar-Medium bewertet, das variierende Mengen an 3-HP enthielt: 0 g/L 3-HP (pH 6,62), 50 g/L 3-HP (pH 3,44), 75 g/L 3-HP (pH 3,28), 100 g/L 3-HP (pH 3,17) und 125 g/L 3-HP (pH 3,08). Die Stämme wurden dann anhand ihrer Fähigkeit, die variierenden Mengen an 3-HP zu tolerieren, in diesem Screening-Verfahren bepunktet.

[0057] Das Wachstum der 718 Hefestämme wurde anschließend in Abwesenheit (SCD-Medium, 0 g/L 3-HP, pH 6,0) oder Gegenwart (SCD-Medium, 70 g/L 3-HP, pH 3,5) von 3-HP in Mikrotiterplatten-Flüssigkulturen unter Verwendung von Bioscreen-C-Geräten, die automatisch inkubieren, schütteln und die Trübung der Kulturen messen können, bewertet. Vorhandene Software zur Modellierung von Kurven des mikrobiellen Wachstums wurde dann eingerichtet, um die Verzögerungsphase, die maximale Wachstumsrate und die Endzell-dichte für jeden Stamm bei allen Versuchsbedingungen zu ermitteln. Für dieses Screening-Verfahren wurde jeder Stamm anhand seiner maximalen Wachstumsrate in Abwesenheit von 3-HP, seiner maximalen Wachstumsrate in Gegenwart von 3-HP und der relativen Differenz zwischen diesen beiden Werten der maximalen Wachstumsrate bepunktet.

[0058] Unter Verwendung eines Liquid-Handling-Roboters wurden die Wachstums- und Glucoseverbrauchsrate der 718 Hefestämme in flüssigem YPD-Medium mit 85 g/L 3-HP (pH 3,5) in Mikrotiterplatten bewertet. Ein automatisierter Ablauf wurde genutzt, um Wachstumsplatten zu inokulieren, Proben für die OD-Messung zu festgelegten Zeitpunkten zu verdünnen und zu zentrifugieren und Überstände für die HPLC-Analyse zu sammeln, die angewendet wurde, um die Restglucosemengen zu festgelegten Zeitpunkten zu messen. Im Gegensatz zu den Bioscreen-C-Wachstumsassays ermöglichte der Roboter-Mikrotiterplatten-Wachstumsassay, dass eine stärkere Belüftung und höhere maximale Zelldichten erreicht wurden, und ermöglichte auch, Glucoseverbrauchsrate statt nur die Wachstumsrate wie die beiden vorangegangenen Assays zu bewerten. Für diesen Screening-Assay wurde jeder Stamm anhand seiner maximalen Zelldichte, die in Gegenwart von 3-HP erhalten wurde, und seiner Fähigkeit, Glucose in Gegenwart von 3-HP bei niedrigem pH-Wert zu verbrauchen, bepunktet.

[0059] Die einzelnen Punktzahlen aus den verschiedenen Assays zur Bewertung der 3-HP-Toleranz wurden gemittelt, um das Endergebnis der 3-HP-Toleranz für jeden der Stämme zu erhalten (Tabelle 12). Diese Screenings zeigten, dass die Hefespezies *Candida apicola*, *Candida humilis*, *Issatchenkia orientalis*, *Kazachstania bulderi*, *Kazachstania exigua*, *Pichia membranifaciens*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Yarrowia lipolytica* eine gute allgemeine Toleranz gegenüber 3-HP bei niedrigem pH-Wert unter variierenden Bedingungen aufwiesen.

[0060] Diese acht 3-HP-toleranten Hefespezies wurden anschließend weiter untersucht auf ihre Toleranz gegenüber 3-HP bei niedrigem pH-Wert in Kultivierungen im Schüttelkolben. Für diese Kultivierungen (definiertes SCD-Medium, hohe Anfangsbiomasse, geringe Belüftung) wurde die Fähigkeit des Stamms, zu wachsen, Glucose zu verbrauchen und Ethanol zu produzieren, in Gegenwart unterschiedlicher Mengen an 3-HP bei variierenden pH-Werten bewertet: 100 g/L 3-HP (pH 4,0), 100 g/L 3-HP (pH 3,5), 100 g/L 3-HP (pH 3,0) und 80 g/L 3-HP (pH 2,6). Diese Kultivierungen im Schüttelkolben zeigten, dass bestimmte *C. humilis*-, *K. bulderi*-, *K. exigua*- und *S. cerevisiae*-Hefestämme eine sehr stabile Toleranz gegenüber hohen Mengen an 3-HP bei niedrigem pH-Wert aufweisen, da sie von den verschiedenen Hefestämmen die höchsten Glucoseverbrauchsrate, Biomasseproduktionsrate und Ethanolproduktionsrate unter diesen harschen Bedingungen hatten. Demgegenüber waren *C. apicola*-, *I. orientalis*-, *P. membranifaciens*- und *Y. lipolytica*-Hefestämme nicht imstande, unter diesen sehr einschränkenden Wachstumsbedingungen zu agieren. Diese detaillierten Folgeanalysen unter Verwendung verschiedener Kultivierungen im Schüttelkolben bestätigten, dass bestimmte *C. humilis*-, *K. bulderi*-, *K. exigua*- und *S. cerevisiae*-Hefestämme ein großes Potenzial als

3-HP-Produktionswirte aufweisen, da sie eine hohe natürliche Toleranz gegenüber 3-HP unter industriell relevanten Bedingungen zeigen.

[Tabelle 12] Toleranz des Hefestamms gegenüber 3-HP

Hefestamm	Hefespezies	Mittlere Punktzahl
VSK-1	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.54
VSK-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.38
VSK-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.03
VSK-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.83
VSK-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.71
VSK-6	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.57
VSK-7	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	3.79
VSK-8	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	0.63
VSK-9	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.58
VSK-10	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	0.08
VSK-11	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.67
VSK-12	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.65
VSK-13	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.24
VSK-14	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.54
VSK-15	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.04
VSK-16	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.46
VSK-17	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.17
VSK-18	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.17
VSK-19	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.28
VSK-20	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.53
VSK-21	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	0.67
VSK-22	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	0.58
VSK-23	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.67
VSK-24	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.13
VSK-25	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.97
VSK-26	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	3.89
VSK-27	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.44
VSK-28	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	0.61
VSK-29	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.44
VSK-30	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.64
VSK-31	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.25
VSK-32	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.49
VSK-33	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.78
VSK-34	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.36
VSK-35	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.36
VSK-36	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.39
VSK-37	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.47
VSK-38	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.82
VSK-39	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.22

Hefestamm	Hefespezies	Mittlere Punktzahl
VSK-40	Saccharomyces pastorianus	1.31
VSK-41	Saccharomyces pastorianus	3.13
VSK-42	Saccharomyces pastorianus	1.44
VSK-43	Saccharomyces pastorianus	1.44
VSK-44	Saccharomyces pastorianus	1.36
VSK-45	Saccharomyces pastorianus	1.28
VSK-46	Saccharomyces pastorianus	1.57
VSK-47	Saccharomyces pastorianus	1.32
VSK-48	Saccharomyces pastorianus	0.44
VSK-49	Saccharomyces pastorianus	1.18
VSK-50	Saccharomyces cerevisiae	1.61
VSK-51	Saccharomyces pastorianus	1.86
VSK-52	Saccharomyces pastorianus	0.94
VSK-53	Saccharomyces pastorianus	1.11
VSK-54	Saccharomyces pastorianus	1.53
VSK-55	Saccharomyces pastorianus	1.36
VSK-56	Saccharomyces pastorianus	0.63
VSK-57	Saccharomyces pastorianus	0.81
VSK-58	Saccharomyces pastorianus	0.25
VSK-59	Saccharomyces pastorianus	1.44
VSK-60	Saccharomyces pastorianus	1.31
VSK-61	Saccharomyces pastorianus	1.40
VSK-62	Saccharomyces pastorianus	2.43
VSK-63	Saccharomyces pastorianus	1.44
VSK-64	Saccharomyces cerevisiae	2.42
VSK-65	Saccharomyces cerevisiae	2.49
VSK-66	Saccharomyces pastorianus	3.42
VSK-67	Saccharomyces cerevisiae	2.78
VSK-68	Saccharomyces pastorianus	0.86
VSK-69	Saccharomyces pastorianus	0.65
VSK-70	Saccharomyces pastorianus	2.57
VSK-71	Saccharomyces pastorianus	1.58
VSK-72	Saccharomyces pastorianus	1.19
VSK-73	Saccharomyces pastorianus	1.33
VSK-74	Saccharomyces cerevisiae	2.71
VSK-75	Saccharomyces pastorianus	1.17
VSK-76	Saccharomyces pastorianus	0.83
VSK-77	Saccharomyces pastorianus	0.79
VSK-78	Saccharomyces cerevisiae	1.46
VSK-79	Saccharomyces cerevisiae	1.13
VSK-80	Saccharomyces cerevisiae	1.25
VSK-81	Saccharomyces cerevisiae	1.97

Hefestamm	Hefespezies	Mittlere Punktzahl
VSK-82	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.65
YSK-83	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.72
VSK-84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.74
VSK-85	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.47
VSK-86	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.00
VSK-87	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.40
VSK-88	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.13
VSK-89	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.25
VSK-90	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.13
VSK-91	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	2.00
VSK-92	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	3.01
VSK-93	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	2.38
VSK-94	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.11
VSK-95	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.10
VSK-96	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.10
VSK-97	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.26
VSK-98	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.51
VSK-99	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.63
VSK-100	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.64
VSK-101	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.69
VSK-102	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.06
VSK-103	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.01
VSK-104	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.44
VSK-105	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.06
VSK-106	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.72
VSK-107	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.39
VSK-108	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.44
VSK-109	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.97
VSK-110	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.74
VSK-111	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	2.72
VSK-112	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.10
VSK-113	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.39
VSK-114	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.42
VSK-115	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.44
VSK-116	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.51
VSK-117	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.75
VSK-118	<i>Saccharomyces bayanus</i>	3.42
VSK-119	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.15
VSK-120	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.32
VSK-121	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.51
VSK-122	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.11
VSK-123	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.49

Hefestamm	Hefespezies	Mittlere Punktzahl
VSK-124	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.96
VSK-125	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.51
VSK-126	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.97
VSK-127	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.75
VSK-128	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.68
VSK-129	<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	2.61
VSK-130	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.01
VSK-131	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.35
VSK-132	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.90
VSK-133	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.07
VSK-134	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.49
VSK-135	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.75
VSK-136	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.36
VSK-137	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.83
VSK-138	<i>Saccharomyces bayanus</i>	1.61
VSK-139	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.07
VSK-140	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.35
VSK-141	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.75
VSK-142	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.04
VSK-143	<i>Saccharomyces bayanus</i>	1.43
VSK-144	<i>Saccharomyces</i> sp.	3.11
VSK-145	<i>Saccharomyces</i> sp.	3.28
VSK-146	<i>Saccharomyces</i> sp.	1.89
VSK-147	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.25
VSK-148	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.01
VSK-149	<i>Saccharomyces bayanus</i>	3.38
VSK-150	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.22
VSK-151	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.75
VSK-152	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.13
VSK-153	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.08
VSK-154	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.46
VSK-155	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.38
VSK-156	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.06
VSK-157	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.00
VSK-158	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	2.75
VSK-159	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.10
VSK-160	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.83
VSK-161	<i>Saccharomyces bayanus</i>	3.15
VSK-162	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.79
VSK-163	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.47
VSK-164	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.43
VSK-165	<i>Saccharomyces bayanus</i>	1.67

Hefestamm	Hefespezies	Mittlere Punktzahl
VSK-166	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.90
VSK-167	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.86
VSK-168	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.17
VSK-169	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.76
VSK-170	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.46
VSK-171	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.65
VSK-172	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.89
VSK-173	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.11
VSK-174	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.61
VSK-175	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.67
VSK-176	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.67
VSK-177	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.88
VSK-178	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.56
VSK-179	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.82
VSK-180	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.54
VSK-181	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.64
VSK-182	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.07
VSK-183	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.32
VSK-184	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.89
VSK-185	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.96
VSK-186	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.51
VSK-187	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.39
VSK-188	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.07
VSK-189	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.71
VSK-190	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.13
VSK-191	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	2.04
VSK-192	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.14
VSK-193	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.99
VSK-194	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.53
VSK-195	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.90
VSK-196	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.46
VSK-197	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.99
VSK-198	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4.11
VSK-199	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.93
VSK-200	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.40
VSK-201	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.83
VSK-202	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.96
VSK-203	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.64
VSK-204	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.28
VSK-205	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.42
VSK-206	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.17
VSK-207	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.13

Hefestamm	Hefespezies	Mittlere Punktzahl
VSK-208	Saccharomyces cerevisiae	3.69
VSK-209	Saccharomyces cerevisiae	3.64
VSK-210	Issatchenkia orientalis	3.07
VSK-211	Issatchenkia orientalis	2.40
VSK-212	Issatchenkia orientalis	2.44
VSK-213	Issatchenkia orientalis	2.60
VSK-214	Issatchenkia orientalis	2.85
VSK-215	Issatchenkia orientalis	2.35
VSK-216	Issatchenkia orientalis	3.04
VSK-217	Zygosaccharomyces kombuchaensis	0.67
VSK-218	Candida glabrata	3.67
VSK-219	Candida glabrata	3.38
VSK-220	Kazachstania exigua	3.89
VSK-221	Kazachstania exigua	3.89
VSK-222	Issatchenkia orientalis	2.01
VSK-223	Issatchenkia orientalis	3.13
VSK-224	Issatchenkia orientalis	2.60
VSK-225	Kazachstania exigua	3.26
VSK-226	Pichia membranifaciens	3.11
VSK-227	Pichia membranifaciens	3.18
VSK-228	Pichia membranifaciens	2.76
VSK-229	Pichia membranifaciens	3.26
VSK-230	Pichia membranifaciens	3.35
VSK-231	Pichia membranifaciens	3.13
VSK-232	Pichia membranifaciens	3.06
VSK-233	Pichia membranifaciens	3.18
VSK-234	Pichia membranifaciens	2.56
VSK-235	Kazachstania exigua	4.13
VSK-236	Saccharomycodes ludwigii	2.94
VSK-237	Zygosaccharomyces kombuchaensis	3.18
VSK-238	Zygosaccharomyces kombuchaensis	2.96
VSK-239	Candida glabrata	3.49
VSK-240	Candida glabrata	1.61
VSK-241	Issatchenkia orientalis	2.79
VSK-242	Kazachstania bulderi	3.38
VSK-243	Kazachstania bulderi	3.60
VSK-244	Candida magnoliae	3.08
VSK-245	Issatchenkia orientalis	1.63
VSK-246	Kazachstania bulderi	3.44
VSK-247	Issatchenkia orientalis	0.00
VSK-248	Issatchenkia orientalis	3.08
VSK-249	Issatchenkia orientalis	3.07

Hefestamm	Hefespezies	Mittlere Punktzahl
VSK-250	Kazachstania exigua	3.00
VSK-251	Candida glabrata	2.49
VSK-252	Issatchenkia orientalis	2.35
VSK-253	Kazachstania exigua	2.33
VSK-254	Saccharomyces ludwigii	2.43
VSK-255	Issatchenkia orientalis	2.68
VSK-256	Kazachstania exigua	3.56
VSK-257	Kazachstania exigua	4.00
VSK-258	Issatchenkia orientalis	2.24
VSK-259	Issatchenkia orientalis	2.79
VSK-260	Issatchenkia orientalis	2.53
VSK-261	Pichia burtonii	0.42
VSK-262	Candida boidinii	1.86
VSK-263	Pichia kluyveri	1.56
VSK-264	Torulaspora delbrueckii	3.19
VSK-265	Kazachstania servazzii	2.40
VSK-266	Zygosaccharomyces rouxii	1.15
VSK-267	Pichia fermentans	2.00
VSK-268	Yarrowia lipolytica	2.86
VSK-269	Candida boidinii	2.46
VSK-270	Candida intermedia	0.65
VSK-271	Candida parapsilosis	1.58
VSK-272	Yarrowia lipolytica	2.10
VSK-273	Candida parapsilosis	2.24
VSK-274	Debaryomyces hansenii	0.25
VSK-275	Pichia guilliermondii	2.32
VSK-276	Kazachstania servazzii	0.72
VSK-277	Rhodotorula glutinis	0.72
VSK-278	Cryptococcus albidus	0.74
VSK-279	Rhodospiridium toruloides	0.67
VSK-280	Debaryomyces occidentalis	1.17
VSK-281	Rhodotorula mucilaginosa	1.54
VSK-282	Candida aurangiensis	1.58
VSK-283	Candida succiphila	2.08
VSK-284	Ambrosiozyma monospora	0.71
VSK-285	Candida arabinofermentans	0.56
VSK-286	Kluyveromyces marxianus	2.06
VSK-287	Lachancea thermotolerans	2.28
VSK-288	Cryptococcus albidus	0.25
VSK-289	Debaryomyces occidentalis	1.76
VSK-290	Rhodotorula mucilaginosa	2.85
VSK-291	Rhodotorula glutinis	0.00

Hefestamm	Hefespezies	Mittlere Punktzahl
VSK-292	Zygosaccharomyces lentus	0.33
VSK-293	Rhodospordium toruloides	0.38
VSK-294	Cryptococcus albidus	0.00
VSK-295	Torulaspora globosa	2.07
VSK-296	Candida stellata	1.36
VSK-297	Cryptococcus laurentii	0.53
VSK-298	Williopsis saturnus	0.76
VSK-299	Cystofilobasidium bisporidii	1.94
VSK-300	Cryptococcus curvatus	1.78
VSK-301	Sporidiobolus salmonicolor	2.17
VSK-302	Pichia jadinii	0.86
VSK-303	Geotrichum klebahnii	0.67
VSK-304	Cryptococcus laurentii	0.19
VSK-305	Debaryomyces hansenii	0.82
VSK-306	Yarrowia lipolytica	1.36
VSK-307	Candida rugosa	1.97
VSK-308	Candida pararugosa	1.68
VSK-309	Debaryomyces occidentalis	0.68
VSK-310	Arxula adeninivorans	1.38
VSK-311	Pichia stipitis	2.17
VSK-312	Cryptococcus albidus	2.19
VSK-313	Candida haemulonii	2.18
VSK-314	Debaryomyces hansenii	0.38
VSK-315	Pichia angusta	0.82
VSK-316	Rhodotorula minuta	0.40
VSK-317	Pichia mandshurica	1.03
VSK-318	Zygosaccharomyces bailii	0.94
VSK-319	Cryptococcus albidosimilis	0.44
VSK-320	Cryptococcus wieringae	0.61
VSK-321	Filobasidium globisporum	0.00
VSK-322	Filobasidium globisporum	0.03
VSK-323	Bulleromyces albus	0.39
VSK-324	Candida anglica	0.56
VSK-325	Candida anglica	0.65
VSK-326	Candida fermentati	2.28
VSK-327	Candida natalensis	0.76
VSK-328	Candida pararugosa	1.08
VSK-329	Candida picinguabensis	0.71
VSK-330	Candida silvae	1.07
VSK-331	Candida solani	0.63
VSK-332	Candida cylindracea	1.22
VSK-333	Cryptococcus curvatus	0.47

Hefestamm	Hefespezies	Mittlere Punktzahl
VSK-334	Cryptococcus macerans	0.58
VSK-335	Cryptococcus macerans	0.33
VSK-336	Cryptococcus magnus	1.57
VSK-337	Cryptococcus magnus	0.57
VSK-338	Cryptococcus victoriae	0.74
VSK-339	Cryptococcus victoriae	0.79
VSK-340	Cryptococcus wieringae	1.19
VSK-341	Cryptococcus mycelialis	0.33
VSK-342	Dioszegia hungarica	2.01
VSK-343	Hanseniaspora sp.	2.32
VSK-344	Hanseniaspora uvarum	2.89
VSK-345	Pichia fabianii	0.85
VSK-346	Rhodotorula pinicola	0.36
VSK-347	Rhodotorula pinicola	0.39
VSK-348	Sporobolomyces ruberrimus	0.50
VSK-349	Sporobolomyces roseus	0.36
VSK-350	Williopsis californica	0.60
VSK-351	Pichia pastoris	0.64
VSK-352	Pichia pastoris	1.01
VSK-353	Pichia pastoris	0.96
VSK-354	Pichia mandshurica	3.00
VSK-355	Pichia heedii	1.26
VSK-356	Pichia punctispora	3.32
VSK-357	Kazachstania	1.19
VSK-358	Schizosaccharomyces pombe	3.49
VSK-359	Torulaspora delbrueckii	0.36
VSK-360	Yarrowia lipolytica	2.82
VSK-361	Yarrowia lipolytica	2.14
VSK-362	Zygosaccharomyces bailii	2.08
VSK-363	Zygosaccharomyces bailii	2.39
VSK-364	Zygosaccharomyces bisporus	0.58
VSK-365	Candida fluviatilis	0.76
VSK-366	Saccharomycopsis capsularis	0.68
VSK-367	Zygosaccharomyces rouxii	2.51
VSK-368	Candida fluviatilis	0.68
VSK-369	Candida humilis	0.36
VSK-370	Candida catenulata	0.47
VSK-371	Debaryomyces hansenii	0.38
VSK-372	Pichia guilliermondii	1.90
VSK-373	Candida intermedia	0.74
VSK-374	Candida lactis-condensi	0.78
VSK-375	Pichia fermentans	1.22

Hefestamm	Hefespezies	Mittlere Punktzahl
VSK-376	Candida pignaliae	0.60
VSK-377	Candida pseudolambica	0.82
VSK-378	Candida rugosa	2.69
VSK-379	Candida sorboxylosa	2.33
VSK-380	Kregervanrija fluxuum	0.28
VSK-381	Citeromyces matritensis	0.60
VSK-382	Debaryomyces polymorphus	1.11
VSK-383	Debaryomyces sp.	1.46
VSK-384	Dekkera anomala	0.75
VSK-385	Dekkera bruxellensis	0.67
VSK-386	Dekkera bruxellensis	0.44
VSK-387	Pichia burtonii	0.64
VSK-388	Pichia burtonii	0.64
VSK-389	Kluyveromyces yarrowii	0.53
VSK-390	Kodamaea ohmeri	2.15
VSK-391	Metschnikowia pulcherrima	0.83
VSK-392	Eromothecium coryli	0.71
VSK-393	Pichia anomala	1.22
VSK-394	Kluyveromyces marxianus	2.07
VSK-395	Saturnispora mendoncae	0.61
VSK-396	Pichia minuta	0.53
VSK-397	Pichia nakasei	0.50
VSK-398	Pichia silvicola	0.50
VSK-399	Pichia stipitis	0.60
VSK-400	Pichia tannicola	2.29
VSK-401	Pichia toletana	0.00
VSK-402	Schizosaccharomyces japonicus	0.17
VSK-403	Pichia haplophila	0.46
VSK-404	Zygosaccharomyces bailii	0.83
VSK-405	Zygosaccharomyces bisporus	1.32
VSK-406	Bulleromyces albus	0.00
VSK-407	Pseudozyma antarctica	0.00
VSK-408	Pichia stipitis	0.25
VSK-409	Cryptococcus wieringae	0.08
VSK-410	Sporobolomyces ruberrimus	3.10
VSK-411	Cryptococcus diffluens	0.29
VSK-412	Cryptococcus curvatus	0.33
VSK-413	Lipomyces tetrasporus	0.46
VSK-414	Candida shehatae	0.42
VSK-415	Lipomyces lipofer	0.00
VSK-416	Lipomyces starkeyi	0.00
VSK-417	Candida apis	1.21

Hefestamm	Hefespezies	Mittlere Punktzahl
VSK-418	Candida sorbophila	1.08
VSK-419	Candida oleophila	0.75
VSK-420	Sporidiobolus salmonicolor	0.50
VSK-421	Candida apicola	1.79
VSK-422	Zygosaccharomyces lentus	0.29
VSK-423	Candida saitoana	0.33
VSK-424	Pichia guilliermondii	1.86
VSK-425	Kluyveromyces lactis	0.88
VSK-426	Pichia jadinii	1.65
VSK-427	Metschnikowia pulcherrima	1.50
VSK-428	toruloides	0.29
VSK-429	Schizosaccharomyces japonicus	1.29
VSK-430	Lachancea thermotolerans	0.75
VSK-431	Candida saitoana	0.71
VSK-432	Dekkera anomala	0.42
VSK-433	Kluyveromyces marxianus	1.69
VSK-434	Kluyveromyces marxianus	1.17
VSK-435	Candida maltosa	2.19
VSK-436	Pichia fabianii	1.33
VSK-437	Candida viswanathii	0.29
VSK-438	Candida catenulata	0.42
VSK-439	Schizosaccharomyces pombe	1.93
VSK-440	Kluyveromyces lactis	0.29
VSK-441	Kazachstania unispora	3.28
VSK-442	Kazachstania unispora	3.24
VSK-443	Pachysolen tannophilus	0.75
VSK-444	Pachysolen tannophilus	0.92
VSK-445	Pichia subpelliculosa	1.76
VSK-446	Trigonopsis variabilis	1.44
VSK-447	Candida versatilis	1.99
VSK-448	Pichia farinosa	0.54
VSK-449	Pichia farinosa	2.04
VSK-450	Kodamaea ohmeri	2.25
VSK-451	Pichia triangularis	2.08
VSK-452	Candida diddensiae	2.17
VSK-453	Pichia quercuum	1.96
VSK-454	Sporidiobolus johnsonii	0.65
VSK-455	Debaryomyces coudertii	0.67
VRK-456	Candida apicola	2.33
VSK-457	Candida humilis	4.25
VSK-458	Rhodotorula mucilaginosa	0.29
VSK-459	Dekkera anomala	0.33

Hefestamm	Hefespezies	Mittlere Punktzahl
VSK-460	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	1.18
VSK-461	<i>Rhodotorula glutinis</i>	0.33
VSK-462	<i>Sporobolomyces roseus</i>	0.25
VSK-463	<i>Pichia anomala</i>	2.21
VSK-464	<i>Candida zeylanoides</i>	2.03
VSK-465	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	2.29
VSK-466	<i>Pichia anomala</i>	2.17
VSK-467	<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	0.42
VSK-468	<i>Lachancea fermentati</i>	1.51
VSK-469	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	0.46
VSK-470	<i>Torulaspora microellipsoides</i>	0.67
VSK-471	<i>Zygotorulaspora florentinus</i>	1.61
VSK-472	<i>Zygosaccharomyces mellis</i>	0.33
VSK-473	<i>Lachancea cidri</i>	2.26
VSK-474	<i>Zygotorulaspora mrakii</i>	2.18
VSK-475	<i>Candida sake</i>	0.42
VSK-476	<i>Candida silvae</i>	1.21
VSK-477	<i>Sporopachydermia lactativora</i>	0.46
VSK-478	<i>Sporopachydermia lactativora</i>	0.46
VSK-479	<i>Clavispora lusitaniae</i>	0.88
VSK-480	<i>Cryptococcus laurentii</i>	0.46
VSK-481	<i>Clavispora lusitaniae</i>	0.63
VSK-482	<i>Naumovia dairenensis</i>	0.63
VSK-483	<i>Candida membranifaciens</i>	0.46
VSK-484	<i>Candida tenuis</i>	0.46
VSK-485	<i>Candida membranifaciens</i>	0.46
VSK-486	<i>Cystofilobasidium infirmo-miniatum</i>	0.50
VSK-487	<i>Candida oleophila</i>	1.08
VSK-488	<i>Rhodotorula minuta</i>	0.42
VSK-489	<i>Pichia farinosa</i>	2.29
VSK-490	<i>Candida solani</i>	0.61
VSK-491	<i>Candida sake</i>	0.63
VSK-492	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	2.21
VSK-493	<i>Pichia angusta</i>	1.79
VSK-494	<i>Candida entomophila</i>	0.50
VSK-495	<i>Candida methanosorbosa</i>	0.46
VSK-496	<i>Candida diddensiae</i>	0.42
VSK-497	<i>Candida sonorensis</i>	1.50
VSK-498	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.88
VSK-499	<i>Zygosaccharomyces kombuchaensis</i>	1.10
VSK-500	<i>Candida mesenterica</i>	0.54
VSK-501	<i>Pichia punctispora</i>	0.54

Hefestamm	Hefespezies	Mittlere Punktzahl
VSK-502	Pichia sp.	1.63
VSK-503	Pichia sp.	2.97
VSK-504	Saccharomyces paradoxus	2.07
VSK-505	Pichia fermentans	1.03
VSK-506	Kregervanrija fluxuum	2.58
VSK-507	Zygosaccharomyces mellis	1.46
VSK-508	Lachancea fermentati	2.25
VSK-509	Cryptococcus liquefaciens	0.17
VSK-510	Filobasidium capsuligenum	0.36
VSK-511	Wickerhamomyces anomalus	1.81
VSK-512	Dipodascus ingens	2.00
VSK-513	Candida santamariae	0.42
VSK-514	Filobasidium capsuligenum	1.06
VSK-515	Dipodascus ingens	2.50
VSK-516	Filobasidium capsuligenum	0.58
VSK-517	Candida anatomiae	0.64
VSK-518	Lindnera fabianii	1.15
VSK-519	Pichia mexicana	0.46
VSK-520	Sporopachydermia cereana	2.10
VSK-521	Sporopachydermia cereana	0.33
VSK-522	Candida sonorensis	1.54
VSK-523	Pichia cactophila	1.47
VSK-524	Pichia cactophila	1.25
VSK-525	Saccharomyces pastorianus	2.63
VSK-526	Saccharomyces cerevisiae	1.72
VSK-527	Saccharomyces cerevisiae	2.50
VSK-528	Saccharomyces cerevisiae	2.25
VSK-529	Saccharomyces cerevisiae	2.75
VSK-530	Saccharomyces cerevisiae	2.71
VSK-531	Saccharomyces cerevisiae	1.54
VSK-532	Saccharomyces cerevisiae	2.79
VSK-533	Saccharomyces cerevisiae	3.07
VSK-534	Saccharomyces cerevisiae	2.38
VSK-535	Saccharomyces cerevisiae	2.22
VSK-536	Saccharomyces cerevisiae	2.47
VSK-537	Saccharomyces cerevisiae	3.08
VSK-538	Saccharomyces cerevisiae	2.35
VSK-539	Saccharomyces cerevisiae	2.82
VSK-540	Saccharomyces cerevisiae	2.83
VSK-541	Saccharomyces cerevisiae	2.88
VSK-542	Saccharomyces cerevisiae	2.50
VSK-543	Saccharomyces cerevisiae	2.44

Hefestamm	Hefespezies	Mittlere Punktzahl
VSK-544	Saccharomyces cerevisiae	2.63
VSK-545	Saccharomyces cerevisiae	3.04
VSK-546	Saccharomyces cerevisiae	2.83
VSK-547	Saccharomyces cerevisiae	2.44
VSK-548	Saccharomyces cerevisiae	2.44
VSK-549	Saccharomyces cerevisiae	2.79
VSK-550	Saccharomyces cerevisiae	2.93
VSK-551	Saccharomyces cerevisiae	3.15
VSK-552	Saccharomyces cerevisiae	2.83
VSK-553	Saccharomyces cerevisiae	2.85
VSK-554	Saccharomyces cerevisiae	3.19
VSK-555	Saccharomyces cerevisiae	2.96
VSK-556	Saccharomyces cerevisiae	2.92
VSK-557	Saccharomyces cerevisiae	2.56
VSK-558	Saccharomyces cerevisiae	2.21
VSK-559	Saccharomyces cerevisiae	2.24
VSK-560	Saccharomyces cerevisiae	2.96
VSK-561	Saccharomyces cerevisiae	3.33
VSK-562	Saccharomyces cerevisiae	2.97
VSK-563	Saccharomyces cerevisiae	3.22
VSK-564	Saccharomyces cerevisiae	3.32
VSK-565	Saccharomyces cerevisiae	3.35
VSK-566	Saccharomyces cerevisiae	3.36
VSK-567	Saccharomyces cerevisiae	3.18
VSK-568	Saccharomyces cerevisiae	3.29
VSK-569	Saccharomyces cerevisiae	3.22
VSK-570	Saccharomyces cerevisiae	2.81
VSK-571	Saccharomyces cerevisiae	3.75
VSK-572	Saccharomyces cerevisiae	3.07
VSK-573	Saccharomyces cerevisiae	3.36
VSK-574	Saccharomyces cerevisiae	3.22
VSK-575	Saccharomyces cerevisiae	3.07
VSK-576	Saccharomyces cerevisiae	2.93
VSK-577	Saccharomyces cerevisiae	3.60
VSK-578	Saccharomyces cerevisiae	3.60
VSK-579	Saccharomyces cerevisiae	3.00
VSK-580	Saccharomyces cerevisiae	2.99
VSK-581	Saccharomyces cerevisiae	3.50
VSK-582	Saccharomyces cerevisiae	3.58
VSK-583	Saccharomyces cerevisiae	3.11
VSK-584	Saccharomyces cerevisiae	3.75
VSK-585	Saccharomyces cerevisiae	3.43

Hefestamm	Hefespezies	Mittlere Punktzahl
VSK-586	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.93
VSK-587	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.08
VSK-588	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.60
VSK-589	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.79
VSK-590	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.96
VSK-591	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.18
VSK-592	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.47
VSK-593	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.07
VSK-594	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.33
VSK-595	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.79
VSK-596	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.51
VSK-597	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.32
VSK-598	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.53
VSK-599	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.46
VSK-600	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.49
VSK-601	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.36
VSK-602	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.51
VSK-603	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.64
VSK-604	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.50
VSK-605	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.50
VSK-606	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.92
VSK-607	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.28
VSK-608	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.32
VSK-609	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.38
VSK-610	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.39
VSK-611	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.56
VSK-612	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.24
VSK-613	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.21
VSK-614	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.32
VSK-615	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.40
VSK-616	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.24
VSK-617	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1.46
VSK-618	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	2.89
VSK-619	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1.13
VSK-620	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1.33
VSK-621	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1.46
VSK-622	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1.46
VSK-623	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	0.92
VSK-624	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	0.96
VSK-625	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1.39
VSK-626	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	0.92
VSK-627	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1.71

Hefestamm	Hefespezies	Mittlere Punktzahl
VSK-628	marxianus	2.17
VSK-629	Kluyveromyces marxianus	2.40
VSK-630	Kluyveromyces marxianus	1.36
VSK-631	Kluyveromyces marxianus	1.40
VSK-632	Kluyveromyces marxianus	1.61
VSK-633	Kluyveromyces marxianus	0.75
VSK-634	Kluyveromyces marxianus	0.83
VSK-635	Pichia fermentans	1.33
VSK-636	Pichia fermentans	1.92
VSK-637	Pichia fermentans	1.81
VSK-638	Pichia fermentans	2.24
VSK-639	Pichia fermentans	0.96
VSK-640	Pichia fermentans	1.72
VSK-641	Pichia fermentans	0.33
VSK-642	Debaryomyces hansenii	0.46
VSK-643	Debaryomyces hansenii	0.54
VSK-644	Debaryomyces hansenii	0.08
VSK-645	Debaryomyces hansenii	2.83
VSK-646	Debaryomyces hansenii	1.46
VSK-647	Debaryomyces hansenii	1.74
VSK-648	Debaryomyces hansenii	0.33
VSK-649	Debaryomyces hansenii	0.50
VSK-650	Debaryomyces hansenii	0.38
VSK-651	Debaryomyces hansenii	0.71
VSK-652	Debaryomyces hansenii	0.83
VSK-653	Debaryomyces hansenii	1.04
VSK-654	Debaryomyces hansenii	0.33
VSK-655	Debaryomyces hansenii	0.42
VSK-656	Saccharomyces pastorianus	1.25
VSK-657	Saccharomyces pastorianus	1.04
VSK-658	Saccharomyces pastorianus	2.51
VSK-659	Saccharomyces pastorianus	2.54
VSK-660	Trichosporon pullulans	2.60
VSK-661	Candida sake	0.63
VSK-662	Candida sake	1.17
VSK-663	Cryptococcus tephrensis	0.63
VSK-664	Cryptococcus tephrensis	0.50
VSK-665	Trichosporon brassicae	0.38
VSK-666	Candida sp.	2.46
VSK-667	Yarrowia lipolytica	2.74
VSK-668	Candida zeylanoides	2.08
VSK-669	Torulopsis sp.	1.07

Hefestamm	Hefespezies	Mittlere Punktzahl
VSK-670	Meyerozyma guilliermondii	2.17
VSK-671	Wickerhamomyces anomalus	1.38
VSK-672	Yarrowia lipolytica	2.94
VSK-673	Candida boidinii	1.17
VSK-674	Pichia membranifaciens	1.63
VSK-675	Pichia membranifaciens	2.88
VSK-676	Candida sp.	2.36
VSK-677	Magnusiomyces ingens	0.75
VSK-678	Trichosporon dulcitum	0.83
VSK-679	Scheffersomyces stipitis	0.71
VSK-680	Yarrowia lipolytica	2.99
VSK-681	Hanseniaspora uvarum	1.83
VSK-682	Hanseniaspora sp.	2.63
VSK-683	Priceomyces carsonii	0.67
VSK-684	Trichomonascus ciferrii	1.29
VSK-685	Trichosporon veenhuisii	0.42
VSK-686	Sugiyamaella smithiae	0.38
VSK-687	Trichosporon aquatile	0.71
VSK-688	Schwanniomyces polymorphus	2.82
VSK-689	Priceomyces haplophilus	1.92
VSK-690	Debaryomyces robertsiae	2.38
VSK-691	Candida rhagii	0.71
VSK-692	Metschnikowia reukaufii	0.88
VSK-693	Metschnikowia agaves	0.88
VSK-694	Komagataella pastoris	0.33
VSK-695	Lodderomyces elongisporus	1.04
VSK-696	Saccharomyces eubayanus	1.63
VSK-697	Candida parapsilosis	2.04
VSK-698	Torulaspora delbrueckii	3.14
VSK-699	Torulaspora delbrueckii	1.29
VSK-700	Hanseniaspora uvarum	2.00
VSK-701	Hanseniaspora osmophila	2.54
VSK-702	Zygosaccharomyces rouxii	0.92
VSK-703	Cryptococcus flavescens	1.13
VSK-704	Torulaspora delbrueckii	2.36
VSK-705	Wickerhamomyces anomalus	2.22
VSK-706	Rhodosporidium toruloides	0.75
VSK-707	Candida sp.	0.71
VSK-708	Pichia jadinii	1.13
VSK-709	Pichia jadinii	1.17
VSK-710	Candida humilis	3.60
VSK-711	Pichia membranifaciens	3.04

Hefestamm	Hefespezies	Mittlere Punktzahl
VSK-712	Rhodosporidium toruloides	1.79
VSK-713	Candida zeylanoides	2.64
VSK-714	Candida diddensiae	0.46
VSK-715	Pichia membranifaciens	1.67
VSK-716	Saccharomyces cerevisiae	1.92
VSK-717	Candida mesenterica	2.13
VSK-718	Saccharomyces cerevisiae	2.79

Beispiel 2: Bioinformatisches Genome Mining bei Enzymkandidaten des Stoffwechsels

[0061] Homologiebasierte Datenbanksuchen wurden durchgeführt, um Enzymkandidaten für eine spezielle Funktionalität zu identifizieren. Die Datenbanken wurden jeweils mit einer Reihe von Abfragesequenzen durchsucht. Zusätzlich wurden die Mitglieder der relevanten Proteinfamilie aus UniProt/SwissProt, basierend auf den InterPro-Domäneneinträgen, abgerufen. Die homologiebasierten Suchen wurden gegen UniProt-Proteindatenbanken (SwissProt und TrEMBL) und GenBank-Proteindatenbanken (nr, pat und env_nr) mittels blastp, und gegen GenBank-Nukleotid-Datenbanken (tsa_nt, env_nt und pat) mittels tblastn durchgeführt. Sequenzen mit einem E-Wert kleiner als $1e-30$ wurden extrahiert; in einigen Fällen wurde jedoch eine zusätzliche Analyse an Sequenzen mit einem E-Wert kleiner als $1e-80$ durchgeführt. Nukleotid-Treffer wurden mit GeneWise mittels der Abfragesequenz als Leitsequenz in der Translation in Proteinsequenzen translatiert. Die Aufgabe der Translation von langen ACC-Sequenzen war zu schwierig für GeneWise, so wurde stattdessen die Proteinsequenz (mit der Abfragesequenz übereinstimmender Teil) aus der Datenausgabe von blastxml extrahiert. Um nicht benötigte Sequenzen zu entfernen, wurden die abgerufenen Sequenzen, mittels BLASTCLUST oder CD-HIT, zu Clustern mit Sequenzen, die zu über 80 % identisch zueinander sind, geclustert. Von jedem Cluster wurde nur eine repräsentative Sequenz behalten. Der nicht benötigte Satz von Sequenzen wurde abgeglichen, entweder mit der PFAM-Domäne der Proteinfamilie oder mittels MAFFT. Ein weltweiter Abgleich mittels MAFFT wurde in Fällen erstellt, in denen die Proteinfamilie nicht mit einer PFAM-Domäne in Zusammenhang stand oder wenn die Sequenz des Proteins auf mehrere PFAM-Domänen aufgeteilt war. Ein phylogenetischer Baum wurde anhand des multiplen Sequenzabgleichs mittels PHYLIP oder FASTTREE erzeugt. Der Baum wurde mit EC-Nummern, Name des Organismus, Blast-E-Werten kommentiert und unter Verwendung der Geneious-Software visualisiert.

2-1: Acetylierende Acetaldehyd-Dehydrogenase

[0062] Die Reduzierung von Acetaldehyd zu Acetyl-CoA kann durch eine acetylierende Acetaldehyd-Dehydrogenase (AADH, E.C. 1.2.1.10) erreicht werden.

[0063] AADHs können in drei Gruppen von funktionalen Homologen unterteilt werden (Wei et al., Nat. Commun. 4:2580, 2013), darunter 1) bifunktionale Proteine mit AADH- und Alkohol-Dehydrogenase-Aktivitäten (E. coli-Gene vom adhE-Typ, GenBank-Nr.: NP_415757 Abfragesequenz), 2) Proteine, die am Ethanolamin-Katabolismus beteiligt sind (E. coli-Gene vom eutE-Typ, GenBank-Nr.: AAG57564, Abfragesequenz) und 3) bifunktionale Proteine, die Teil eines Aldolase-Dehydrogenase-Komplexes sind, der am 4-Hydroxy-2-Ketovalerat-Katabolismus beteiligt ist (E. coli-Gene vom mphF-Typ, GenBank-Nr.: NP_414885). Von besonderem Interesse sind die Enzyme der Gruppe 1 (adhE-Typ) und der Gruppe 2 (eutE-Typ).

[0064] Die N-terminale Domäne des AdhE-Proteins ist hochgradig homolog zu Aldehyd:NAD⁺ Oxidoreduktasen, wogegen die C-terminale Region homolog zu einer Familie von Fe²⁺-abhängigen Ethanol:NAD⁺ Oxidoreduktasen ist (Membrillo-Hernandez et al., J. Biol. Chem. 275:33869-33875, 2000). Acetylierende Acetaldehyd-Dehydrogenase-Aktivität kann auch in die Zelle durch Trunkieren des bifunktionalen AdhE-Proteins eingeführt werden, um nur die N-terminale Aldehyd-Reduktase-Domäne durch Entfernen der Alkohol-Dehydrogenase-Domäne zu besitzen. Weitere Gene mit dieser bifunktionalen AADH-Aktivität wurden auf Grundlage bioinformatischer Analysen und Sequenzhomologie geschlussfolgert. Die verschiedenen Gene werden in Tabelle 1 zusammengefasst.

[0065] Viele Enterobakterien können Ethanolamin als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle nutzen (Stojiljkovic et al., J. Bacteriol. 177:1357-1366, 1995). Dieser katabole Komplementweg schließt einen Schritt ein, in dem

Acetaldehyd durch acetylierende Acetaldehyd-Dehydrogenase, EutE, in Acetyl-CoA umgewandelt wird. Neuartige Gene mit dieser AADH-Aktivität wurden auf Grundlage bioinformatischer Analysen und Sequenzhomologie geschlussfolgert. Die verschiedenen Gene werden in Tabelle 2 zusammengefasst.

[0066] Darüber hinaus gibt es auf Grundlage bioinformatischer Analysen und Sequenzhomologie zu den Genen vom adhE- und eutE-Typ eine Gruppe von Genen, die als Aldehyd-Dehydrogenasen vermerkt werden, von denen geschlussfolgert werden kann, eine AADH-Aktivität zu haben. Die verschiedenen Gene werden in Tabelle 3 zusammengefasst.

2-2: Eukaryotische Acetyl-CoA-Carboxylase

[0067] Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC, EC 6.4.1.2) ist eine multifunktionale Biotinabhängige Carboxylase, die ein zentrales Enzym der Fettsäure-Biosynthese ist. Sie verwendet die Kofaktoren ATP und Biotin, um die Umwandlung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA zu katalysieren. Die Reaktion verläuft in zwei Schritten. Erstens katalysiert die Biotin-Carboxylase die ATP-abhängige Carboxylierung von Biotin mit Bicarbonat. Zweitens überträgt die Carboxyl-Transferase die Carboxyl-Gruppe vom Biotin zum Acetyl-CoA, um Malonyl-CoA zu bilden. Eukaryotische Enzyme sind große Multidomänen-Enzyme, wogegen entsprechende prokaryotische Enzyme aus mehreren Untereinheiten bestehen, die durch unterschiedliche Gene codiert werden.

[0068] Die Aktivität von ACC wird auf der transkriptionellen Ebene und auch auf der post-transkriptionellen Ebene (z.B. durch Phosphorylierung und Aggregation) geregelt, um die Acetyl-CoA-Homöostase zu erhalten. ACC-Manipulation in verschiedenen Hefearten führte zu erhöhter ACC-Aktivität und erhöhter Produktion von Malonyl-CoA-abgeleiteten Produkten. Gene, die für Enzyme mit ACC-Aktivität codieren, wurden in *Saccharomyces cerevisiae* (GenBank-Nr.: CAA96294.1, Abfragesequenz), *Yarrowia lipolytica* (GenBank-Nr.: XP_501721.1, Abfragesequenz) und *Mucor circinelloides* (GenBank-Nr.: EPB82652.1 Abfragesequenz) nachgewiesen oder postuliert. Acetyl-CoA-Carboxylase-Kandidatengene wurden in den neu sequenzierten Genomen von *Kazachstania exigua* (SEQ ID NR: 1) und *Candida humilis* (SEQ ID NR: 2) identifiziert und in unser Hefe-Expressionsplasmid geklont. Weitere Gene mit ACC-Aktivität wurden auf Grundlage bioinformatischer Analysen und Sequenzhomologie geschlussfolgert. Die verschiedenen eukaryotischen Multidomänen-ACC-Gene werden in Tabelle 4 zusammengefasst.

2-3: Bifunktionale Malonyl-CoA-Reduktase

[0069] Die Reduzierung von Malonyl-CoA zu 3-HP (über ein Malonat-Semialdehyd-Zwischenprodukt) kann durch eine große bifunktionale Malonyl-CoA-Reduktase erreicht werden, die beide Funktionalitäten der C-terminalen Aldehyd-Dehydrogenase-Domäne und N-terminalen Alkohol-Dehydrogenase-Domäne besitzt. Ein hochgradig Substrat-spezifisches und NADPH-abhängiges Enzym mit dieser Aktivität wurde in dem phototrophischen, grünen Nichtschwefel-Bakterium *Chloroflexus aurantiacus* (GenBank-Nr.: AAS20429.1; Abfragesequenz) beschrieben, das an einem autotrophen CO₂-Fixierungsweg beteiligt ist, der als 3-Hydroxypropionat-Zyklus bezeichnet wird (Hugler et al., J. Bacteriol. 184:2404-2410, 2002). Weitere Gene mit dieser bifunktionalen Malonyl-CoA-Reduktase-Aktivität wurden auf Grundlage bioinformatischer Analysen und Sequenzhomologie geschlussfolgert. Die verschiedenen Gene werden in Tabelle 5 zusammengefasst.

2-4: Malonyl-CoA-Reduktase

[0070] Im Gegensatz zu den vorhergehend erörterten bifunktionalen Malonyl-CoA-Reduktasen kann Malonyl-CoA auch durch zwei separate Enzyme zu 3-HP katalysiert werden. Durch diese Route wird Malonyl-CoA zunächst durch Malonyl-CoA-Reduktase zu Malonat-Semialdehyd (MCR; EC 1.2.1.75) oder einer CoA-acylierenden Malonat-Semialdehyd-Dehydrogenase reduziert und anschließend durch eine 3-Hydroxypropionat-Dehydrogenase zu 3-HP reduziert (3-HPDH; EC 1.1.1.59 oder EC 1.1.1.298). MCR ist ein NADPH-abhängiges Enzym, das von einigen thermoacidophilen Archaeen verwendet wird, um Kohlenstoff autotroph in organisches Material über einen 3-Hydroxypropionat/4-Hydroxybutyrat-Zyklus zu fixieren (Berg et al., Science, 318:1782-1786, 2007). Gene, die für Enzyme mit dieser MCR-Aktivität codieren, werden in *Metallorphaera sedula* (GenBank-Nr.: ABP94884.1, Abfragesequenz) und *Sulfolobus tokodaii* (GenBank-Nr.: BAB67276.1 Abfragesequenz) beschrieben. Obwohl diese MCRs eine ähnliche Aldehyd-Dehydrogenase-Aktivität mit den bifunktionalen Malonyl-CoA-Reduktase-Enzymen von *Chloroflexus aurantiacus* gemeinsam haben, weisen sie keine signifikante Sequenzähnlichkeit auf, was darauf hindeutet, dass sich die autotrophen Komplementwege bei *Chloroflexus* und *Sulfolobaceae* konvergent entwickelt haben und dass verschiedene Gene rekrutiert wurden, um ähnliche metabolische Prozesse in diesen taxonomischen Gruppen auszuführen (Alber et al., J. Bacteriol. 188:8551-8559, 2006). Insbesondere die Archaeen-MCRs zeigen eine hohe

Sequenzähnlichkeit zu Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenasen. Weitere Gene mit dieser MCR-Aktivität wurden auf Grundlage bioinformatischer Analysen und Sequenzhomologie geschlussfolgert. Die verschiedenen Gene werden in Tabelle 6 zusammengefasst.

2-5: 3-Hydroxypropionat-Dehydrogenase

[0071] Malonat-Semialdehyd kann durch eine reversible 3-Hydroxypropionat-Dehydrogenase zu 3-HP (HPDH; EC 1.1.1.59, NADH-abhängig) oder eine Malonat-Semialdehyd-Reduktase (EC 1.1.1.298, NADPH-abhängig) reduziert werden. Diese Enzyme sind natürlicherweise am beta-Alanin-Metabolismus, Propanoat-Metabolismus oder an der Uracil-Degradation in Bakterien und Pflanzen beteiligt. Darüber hinaus sind diese Enzyme für einige thermoacidophile Archaeen zur Fixierung von Kohlenstoff über den 3-Hydroxypropionat/4-Hydroxybutyrat-Zyklus erforderlich (Kockelkorn and Fuchs, J. Bacteriol. 191:6352-6362, 2009). Gene, die für Enzyme mit 3-Hydroxypropionat-Dehydrogenase- oder Malonat-Semialdehyd-Reduktase-Aktivität codieren, wurden in *Escherichia coli* (GenBank-Nr.: EFV00080.1, Abfragesequenz), *Saccharomyces cerevisiae* (GenBank-Nr.: DAA10125.1, Abfragesequenz), *Metallosphaera sedula* (GenBank-Nr.: ABP96133.1, Abfragesequenz), *Sulfolobus tokodaii* (GenBank-Nr.: BAK54608.1, Abfragesequenz) und *Escherichia coli* (GenBank-Nr.: ACR64730.1 Abfragesequenz) nachgewiesen oder postuliert. Weitere Gene mit 3-Hydroxypropionat-Dehydrogenase- oder Malonat-Semialdehyd-Reduktase-Aktivität wurden auf Grundlage bioinformatischer Analysen und Sequenzhomologie geschlussfolgert. Die verschiedenen Gene werden in Tabelle 7 zusammengefasst.

2-6: 3-Hydroxyisobutyrat-Dehydrogenase

[0072] 3-Hydroxyisobutyrat-Dehydrogenase (HIBADH; EC 1.1.1.31) ist ein zentrales Enzym, das am Metabolismus von Valin und den anderen verzweigtkettigen Aminosäuren beteiligt ist. HIBADH katalysiert die NADH- oder NADPH-abhängige reversible Umwandlung von 3-Hydroxyisobutyrat zu Methylmalonat-Semialdehyd. Als Ergebnis seiner breiten Substratspezifität wurde für HIBADH jedoch auch gezeigt, dass es über 3-Hydroxypropionat-Dehydrogenase-Aktivität (d.h. EC 1.1.1.59) durch Umwandlung von Malonat-Semialdehyd zu 3-HP (Yao et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 160:694-703, 2010) verfügt. Enzyme mit HIBADH-Aktivität wurden in *Pseudomonas putida* (GenBank-Nr.: ADR61938.1, Abfragesequenz), *Pseudomonas aeruginosa* (GenBank-Nr.: AAG06957.1, Abfragesequenz), *Bacillus cereus* (GenBank-Nr.: AAP10961.1, Abfragesequenz) und *Alcaligenes faecalis* (GenBank-Nr.: EJC65559.1 Abfragesequenz) identifiziert. Weitere Gene mit dieser HIBADH-Aktivität wurden auf Grundlage bioinformatischer Analysen und Sequenzhomologie geschlussfolgert. Die verschiedenen Gene werden in Tabelle 8 zusammengefasst.

2-7: 4-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase

[0073] 4-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (HBDH; EC 1.1.1.61) ist ein Enzym, das natürlicherweise am Butanoat-Metabolismus beteiligt ist. HBDH katalysiert die reversible NAD⁺-abhängige Umwandlung von 4-Hydroxybutanoat zu Sukzinat-Semialdehyd. HBDH kann jedoch auch Malonat-Semialdehyd zu 3-HP umwandeln, da die enzymatische Reaktion ähnlich ist. Enzyme mit HBDH-Aktivität wurden in *Cupriavidus necator* (GenBank-Nr.: AAC41425.1, Abfragesequenz) und *Clostridium kluyveri* (GenBank-Nr.: EDK35022.1 Abfragesequenz) identifiziert. Weitere Gene mit dieser HBDH-Aktivität wurden auf Grundlage bioinformatischer Analysen und Sequenzhomologie geschlussfolgert. Die verschiedenen Gene werden in Tabelle 9 zusammengefasst.

2-8: 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase

[0074] 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (BDH; EC 1.1.1.30) ist ein Enzym, das natürlicherweise am Butanoat-Metabolismus beteiligt ist. BDH katalysiert die reversible NAD⁺-abhängige Umwandlung von 3-Hydroxybutyrat zu Acetoacetat, aber es kann auch andere 3-Hydroxymonocarboxylsäuren oxidieren. Zum Beispiel kann BDH Malonat-Semialdehyd zu 3-HP umwandeln, da die enzymatische Reaktion ähnlich ist. Ein Enzym mit BDH-Aktivität wurde in *Pseudomonas aeruginosa* (GenBank-Nr.: GAA17557.1 Abfragesequenz) identifiziert. Weitere Gene mit dieser BDH-Aktivität wurden auf Grundlage bioinformatischer Analysen und Sequenzhomologie geschlussfolgert. Die verschiedenen Gene werden in Tabelle 10 zusammengefasst.

Beispiel 3: Messung von Enzymaktivitäten

ACC spektrophotometrische Enzymassays

[0075] Spektrophotometrische ACC-Assays sind gekoppelte Assays, in denen ein Produkt, das durch ACC-Reaktion produziert wurde, weiter in einer Reaktion verbraucht wird, die den Kofaktor NAD(P)H erfordert, dessen Oxidation mit einem Spektralphotometer überwacht werden kann.

[0076] Kröger et al. (2011, Anal. Biochem. 411:100-105) haben einen gekoppelten Assay beschrieben, bei dem durch ACC1 produziertes Malonyl-CoA weiter durch gereinigte Malonyl-CoA-Reduktase (MCR) in einer Reaktion, die NADPH als Kofaktor erfordert, zu Malonat-Semialdehyd umgewandelt wird. ACC-Aktivität wurde durch Verfolgen der NADPH-Oxidation gemessen.

[0077] Diacovich et al. (2002, J. Biol. Chem. 277:31228-31236) kombinierte die Umwandlung von ADP, einem Hydrolyseprodukt von ATP, das als Kofaktor in der ACC-Reaktion verwendet wird, mit einer ADP-erfordernden Pyruvat-Kinase-Reaktion, die des Weiteren an die Bildung von Pyruvat unter Verwendung von Lactatdehydrogenase gekoppelt wurde. Das letztere Enzym erfordert NADH als Kofaktor, dessen Oxidation verfolgt wurde.

ACC radioaktive Enzymassays

[0078] Der am häufigsten verwendete In-vitro-ACC-Assay basiert auf der Verwendung von radioaktivem C¹⁴-Carbonat. Die Inkorporation radioaktiven Carbonats in eine Säure und einem nicht-flüchtigen Stoff (d.h. Malonyl-CoA) wird verfolgt. Das ¹⁴C-markierte Natriumbicarbonat, das nicht zu Malonyl-CoA umgewandelt wurde, wird durch eine Säure und Wärmebehandlung entfernt, die das verbleibende NaH₁₄CO₃ und die möglichen Nebenprodukte der Reaktion in ¹⁴C-markiertes CO₂ umwandelt.

[0079] Dieser durch Diacovich et al. (2002, J. Biol. Chem. 277:31228-31236) beschriebene Assay wurde mit geringfügigen Änderungen verwendet, um ACC-Aktivität in Hefe-Lysaten zu erkennen (Shi et al. 2014, mBIO 5:3 e01130-14). Die Zell-Lysate wurden aus Hefezellen zubereitet, die während der späten exponentiellen oder stationären Phase gewonnen wurden. Die Zellen wurden gewaschen und anschließend in Lysepuffer resuspendiert, der 100 mM Kaliumphosphat pH 7,5, 2 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol und 1x EDTA-freien Complete-Proteasehemmer (Roche) enthielt. Die Zellen wurden durch Glasperlen zerschlagen und der Überstand wurde nach der Zentrifugierung bei 4 °C gesammelt.

[0080] Das ACC-Enzymassay-Reaktionsgemisch wies 100 mM Kaliumphosphat (pH 8,0), 300 µg BSA, 3 mM ATP, 5 mM MgCl₂, 10 mM NaH₁₄CO₃ [spezifische Aktivität 200 µCi mmol⁻¹ (7400 kBq mmol)] und 0,5 mM Acetyl-CoA auf. Gesamtvolumen der Reaktion war 100 µl, das 20 µl Zellextrakt aufwies.

[0081] Die Reaktion wurde bei 30 °C für 15 min inkubiert und durch Zugabe von 50 µl 5 M HCl gestoppt. Der Inhalt der Röhrchen wurde bei 95 °C zur Trockne verdampft und der Rückstand wurde in 100 µl Wasser resuspendiert und mit 3 ml des Szintillationscocktails (Ultima Gold AB, PerkinElmer) gemischt. Der ¹⁴C-Gehalt der Proben wurde unter Verwendung eines Flüssigkeits-Szintillationszählers (PerkinElmer Tri-Carb 2810TR) bestimmt.

AADH-Enzymassay

[0082] AADH-Aktivität wurde, wie von Kozak et al. (2014, Metab. Eng. 21:46-59) beschrieben, durch die Überwachung der Reduktion von NAD⁺ bei 340 nm bei 30 °C gemessen. Die Hefezellen für die Zell-Lysate wurden gesammelt, mit Wasser gewaschen und dann in Lysepuffer resuspendiert, der 100 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,5) und 1X EDTA-freien Proteasehemmer-Cocktail (Roche) enthielt. Die Zellen wurden mit Glasperlen in einem Precellys 24 Homogenisierer bei 5500 U/min für 3x40 Sekunden lysiert und zwischen den Runden auf Eis gehalten. Lysate wurden bei 16 000 g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert und Überstände wurden gesammelt. Die gesamte Proteinkonzentration wurde unter Verwendung der Bradford-Methode bestimmt.

[0083] Das Enzym-Assay-Reaktionsgemisch enthielt 0,1 mM Coenzym A, 50 mM CHES-Puffer (pH 9,5), 0,8 mM NAD⁺, 0,2 mM DTT und 10 µl Zellenextrakt in einem gesamten Reaktionsvolumen von 200 µl. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 mM frisch zubereiteter Acetaldehyd-Lösung gestartet und die Reduktion von NAD⁺ wurde mit einem Thermo Konelab 20XT-Analysator verfolgt.

MCR-Enzymassay aus Hefezell-Lysaten

[0084] Die MCR-Enzymaktivität wurde gemäß der von Chen et al. beschriebenen Methode (2014, Metab. Eng. 22:104-109) mit geringfügigen Änderungen gemessen. Die Methode basiert auf der Überwachung der Oxidation von NAD(P)H bei 340 nm.

[0085] Zellen wurden gesammelt und mit kaltem Waschpuffer mit 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 20 mM NaN₃ gewaschen und dann in 1 ml Abbaupuffer resuspendiert, der 50 mM HEPES (pH 7,5), 150 mM KCl 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0,5 % Triton X-100 und 1X EDTA-freien Proteasehemmer-Cocktail (Roche) enthielt. Die Zellen wurden mit Glasperlen in einem Precellys 24 Homogenisierer bei 5500 U/min für 3x40 Sekunden lysiert und zwischen den Runden auf Eis gehalten. Lysate wurden bei 16 000 g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert und Überständen wurden gesammelt. Die gesamte Proteinkonzentration wurde unter Verwendung der Bradford-Methode bestimmt.

[0086] Das MCR-Assay-Gemisch enthielt 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0), 5 mM MgCl₂, 0,3 mM NADPH oder NADH. Nach Zugabe von 20 µl Zell-Lysat in ein gesamtes Reaktionsvolumen von 200 µl wurde die Reaktion für fünf Minuten bei 30 °C prä-inkubiert, nach denen die Reaktion durch Zugabe von 0,15 mM Malonyl-CoA gestartet wurde. Der Assay wurde bei 340 nm mit einem Thermo Konelab 20XT-Analysator überwacht.

Herstellung von Hefe-Expressionsvektoren

[0087] Eine Reihe von Hefe-Expressionsplasmiden wurden hergestellt, um die Kandidatengene auf ihre Expressions- und Aktivitätsfähigkeiten in Hefe zu bewerten. Erstens wurde ein neuer, pBlueScript-basierter Polylinker (MCS) so konzipiert, dass alle möglichen Restriktionsenzym-(RE)-Stellenkombinationen verwendet werden könnten. Dieser veränderte MCS wurde dann in die pRS-basierte Reihe von zentromerischen und Multikopie-Hefepiasmiden eingesetzt. Darauf folgend wurden unter Verwendung eines Satzes von 10 einzigartigen RE-Stellen neun unterschiedliche Sätze von Promotern und Terminatoren in diese pRS-basierte Hefe-Expressionsvektoren geklont. Somit könnte dieses Plasmidsystem genutzt werden, um bis zu 9 Gene gleichzeitig konstitutiv entweder mit einer niedrigen oder hohen Kopieanzahl in einem geeigneten Hefestamm zu exprimieren, um eine Vielzahl von Komplementweg-Enzymkombinationen für die Produktion von 3-HP zu bewerten.

Klonen der ACC-Gene

[0088] ACC1-Gene, die in den industriellen *S. cerevisiae* VSK-128-Stamm mit und ohne SNF1-Deletion umgewandelt wurden, werden in Tabelle 13 dargestellt. ACC-Gene wurden von einem Multikopie-Plasmid exprimiert, wo sie unter Kontrolle des PDC1-Promoters standen. Mutierte ACC1sc-Gene, die in einer Veröffentlichung von Shi et al. (2014) beschrieben wurden, wurden mit einem QuikChange II Site Mutagenese Kit (Agilent Technologies) konstruiert.

Tabelle 13. Acetyl-CoA-Carboxylase-Gene, umgewandelt zu *S. cerevisiae* VSK-128.

ACC1sc	<i>S. cerevisiae</i> -Wildtyp ACC1
ACC1sc ^{S659A}	<i>S. cerevisiae</i> S659A-Mutante ACC1
ACC1sc ^{S1157A}	<i>S. cerevisiae</i> S1157A-Mutante ACC1
ACC1sc ^{S659A/S1157A}	<i>S. cerevisiae</i> S659A/S1157A-Mutante ACC1
ACC1ch	<i>C. humilis</i> -Wildtyp ACC
ACC1ke	<i>K. exigua</i> -Wildtyp ACC
ACC1mc	<i>M. Circinelloides</i> -Wildtyp ACC
ACC1yl	<i>Y. lipolytica</i> -Wildtyp ACC

ACC-Enzymassays

[0089] In der Literatur wurden spektralphotometrische Assays verwendet, um ACC-Enzymaktivität mit gereinigten oder teilweise gereinigten ACC-Enzymen zu erkennen. Spektrophotometrische Assays wurden mit

Hefezell-Lysaten getestet, in denen ACC überexprimiert wurde, aber keine Absorptionsänderung im Vergleich zu den Kontrollen erkannt wurde.

[0090] Der radioaktive ACC-Enzymassay ist sehr empfindlich, auch wenn pmol/mg/min-Aktivitäten erkannt werden können. Das Verfahren wurde zum ersten Mal mit gereinigtem menschlichen ACC-Enzym getestet, das kommerziell erhältlich ist. Als klare Aktivität festgestellt wurde, wurde das Verfahren weiter optimiert, um ACC-Aktivität aus Hefezell-Lysaten zu erkennen. Die in der Tabelle 13 aufgeführten Stämme wurden auf ihre ACC1-Aktivität und auf der Grundlage der Ergebnisse getestet; eine Liste, die die relative Rangfolge der ACC1s beschreibt (**Abb. 2**), wurde erstellt. Der aussichtsreichste Kandidat ACCyl wurde weiter untersucht und die Ergebnisse des *S. cerevisiae* S-128-Wildtyp-Stamms und desselben Stamms, in dem ACC1 überexprimiert wurde, werden in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14. Die Überexpression des ACCyl-Gens führte zu einem 2,9-fachen Anstieg in der ACC1-Enzymaktivität im Vergleich zu der endogenen ACC1-Aktivität des Wildtyp-*S. cerevisiae* VSK-128-Stamms.

	Mittlere ACC1-Aktivität (pmol min ⁻¹ mg Gesamt-protein ⁻¹)	Std. Abw.	Anzahl der Replikate
<i>S. cerevisiae</i> VSK-128 Wildtyp	25,55	0,74	2
<i>S. cerevisiae</i> VSK-128 (ACCyl)	73,79	17,23	4

AADH In-vitro-Enzymaktivitätsassays

[0091] Fünf AADH-Gene wurden ursprünglich ausgewählt (d.h. ADHEpm, ADHEec, EUTec, EUTdz und LIN1129li) und wurden in den CEN.PK-Laborstamm umgewandelt. Diese AADHs wurden von einem Multikopie-Plasmid exprimiert, wo sie unter Kontrolle des TEF1-Promoters standen. Alle fünf AADH-Gene zeigten AADH-Aktivität, aber die drei AADH-Gene vom eutE-Typ (d.h. EUTec, EUTdz und LIN1129li) ergaben eine viel höhere AADH-Aktivität in Hefe im Vergleich zu den AADHs vom adhE-Typ (d.h. ADHEpm und ADHEec).

[0092] Zwanzig weitere neuartige AADH-Gene wurden aus den Genomanalysen ausgewählt, um auf Expression und Enzymaktivität in Hefe bewertet zu werden. Diese zwanzig neuartigen AADH-Gene wurden auf In-vitro-Enzymaktivität getestet und bei vier von ihnen (d.h. AADHmm, AADHab, AADHbw und AADHvs) wurde gezeigt, dass sie AADH-Aktivität haben.

AADH In-vivo-Wachstumsassays

[0093] Alle Kopien der ACS2-Gene wurden bei dem industriellen *S. cerevisiae* VSK-128-Stamm entfernt, um einen Stamm mit einem defekten PDH-Bypass herzustellen, der unfähig war, auf Glucose-basiertem Medium zu wachsen. Expressionsvektoren, die 25 verschiedene AADH-Varianten tragen, wurden daraufhin in diesem ACS2-Deletionsstamm umgewandelt, um ihre Fähigkeit zur Wiederherstellung des Wachstums dieses Stamms auf Glukose zu bewerten.

[0094] Zwölf verschiedene AADH-Varianten (d.h. EUTEec, EUTEdz, LIN1129li, AADHmm, AADHtl, AADHab, AADHta, AADHbs, AADHbw, AADHvs, AADHhs und ADHEec) waren fähig, das Wachstumsdefizit des ACS2-Deletionsstamms auf Grundlage ihrer Fähigkeit wiederherzustellen, auf Glucose-basierten Agarplatten zu wachsen. Es gab eine gute Korrelation zwischen den In-vitro-AADH-Enzymaktivitätsassays und den In-vivo-Wachstumswiederherstellungsanalysen.

[0095] Die Wachstumsrate der ersten neun AADH-Variantenstämme, von denen festgestellt wurde, dass sie fähig waren, das Wachstum des ACS2-Deletionsstamms wiederherzustellen, wurden daraufhin in Kultivierungen im Schüttelkolben bewertet und mit dem Wildtyp-Stamm verglichen, der den intakten PDH-Bypass enthält. Alle neun dieser AADH-Varianten waren fähig, >50 % der aeroben Wachstumsrate des *S. cerevisiae* VSK-128-Stamms zu erhalten, wenn sie auf Glukose wuchsen, und sechs dieser AADH-Varianten waren fähig, ≥80 % der aeroben Wachstumsrate des *S. cerevisiae* VSK-128-Stamms zu erhalten.

MCR-Enzymassays in Hefen

[0096] Die acht Vollängen-Chloroflexus-MCR-Homologe wurden in ihre zwei funktionalen Domänen trunziert und die MCR-spezifischen Domänen wurden auf Enzymaktivität in Hefe zusammen mit den sechs Archae-

MCRs getestet. Diese MCRs wurden von einem Multikopie-Plasmid exprimiert, wo sie unter Kontrolle des TEF1-Promotors standen und wurden in den CEN.PK-Laborstamm umgewandelt.

[0097] MCRca (*Chloroflexus aurantiacus*) und sein Homolog MCRrc (*Roseiflexus castenholzii*) waren die einzigen zwei *Chloroflexus*-MCR-Homologe, die bei Verwendung von NADPH als Kofaktor eine MCR-Enzymaktivitäten ergaben, die höher als bei dem Wildtyp-Stamm war. Kein Enzymaktivität wurde bei diesen acht *Chloroflexus* MCR-Homologen bei Verwendung von NADH als Kofaktor beobachtet.

[0098] Drei der Archaeen-MCRs [*Sulfolobales archaeon*, *Sulfolobus acidocaldarius* (x2)] ergaben MCR-Enzymaktivitäten, die bei Verwendung von NADPH als Kofaktor höher als beim Wildtyp-Stamm waren und alle sechs der Archaeen-MCRs ergaben MCR-Enzymaktivitäten, die bei Verwendung von NADH als Kofaktor höher als beim Wildtyp-Stamm waren.

Heterologe Expression und Charakterisierung von Archaeen-MCRs

[0099] Auf pBAT T7 Promoter basierende Expressionskonstrukte wurden für vier unterschiedliche MCRs von Archaeen hergestellt, *Metallosphaera sedula* (MCRms), *Sulfolobus tokodai* (MCRst), *Candidatus caldiar-chaeum* (MCRcc) und *Sulfolobales archaeon* (MCRsa1). Diese Konstrukte enthalten kein Reinigungs-Tag und waren für *E. coli* codonoptimiert und wurden unter den zuvor in diesem Bericht beschriebenen Bedingungen exprimiert (Tabelle 15).

Tabelle 15. Übersicht über Konstrukte von Archaeen-MCRs zur Expression in *E. coli*. (ca - *Chloroflexus aurantiacus*, ms - *Metallosphaera sedula*, st - *Sulfolobus tokodaii*, cc – *Candidatus caldiarchaeum*, sa1- *Sulfolobales archaeon*, sa2 – *Sulfolobales acidocaldarius*)

MCR-Variante	Position des StrepII-Tag s	Länge des M CR-Gens (bp)	Berechnetes MW der MCR (kDa)
MCRca (<i>E. coli</i> codonoptimiert)	N-terminal	2037 bp	74,5
MCRms (Hefe-codonoptimiert)	C-terminal	1098 bp	40,4
MCRst (Hefe-codonoptimiert)	C-terminal	1095 bp	40,3
MCRms (<i>E. coli</i> codonoptimiert)	N-terminal	1098 bp	40,4
MCRsal (<i>E. coli</i> codonoptimiert)	N-terminal		
MCRst (<i>E. coli</i> codonoptimiert)	N-terminal		
MCRcc (<i>E. coli</i> codonoptimiert)	N-terminal		
MCRms (<i>E. coli</i> codonoptimiert)	Kein Tag	1098 bp	40,4
MCRsal (<i>E. coli</i> codonoptimiert)	Kein Tag	1074 bp	40
MCRst (<i>E. coli</i> codonoptimiert)	Kein Tag	1095 bp	40,3
MCRcc (<i>E. coli</i> codonoptimiert)	Kein Tag	1053 bp	40
MCRsa2 (<i>E. coli</i> codonoptimiert)	Kein Tag	1065 bp	39,2

[0100] Ihre Aktivität wurde unter Verwendung der folgenden Assay-Bedingungen analysiert: 0,4 mM NAD(P) H; 0,15 mM Malonyl-CoA; Tris-HCl pH 7; 2 mM MgCl₂. Assays mit 20-fach verdünnten Lysaten wurden im Mikrotiterplatten (MTP)-Format bei RT durchgeführt. Die Oxidation von NADPH oder NADH an A³⁶⁵ wurde im Zeitverlauf verfolgt. MCRsal und MCRst zeigten von den vier getesteten Archaeen-Genen die höchste MCR-Aktivität. Die MCR-Aktivitäten waren jedoch kleiner als diejenigen, die für das getaggte MCRca gemessen wurden. An NADPH oder NADH konnte bei der Candidatus caldiarchaeum MCR (MCRcc) (in dem *E. coli* Zelllysat) keine Aktivität gemessen werden.

[0101] Beim Analysieren dieser Konstrukte unter Verwendung von SDS-PAGE Gelen zeigte MCRsal die höchsten Expressionsniveaus in dem E. coli Lysat, während MCRcc nicht in löslicher Form exprimiert werden konnte; siehe das Gel (sa1 > ca > st > ms > cc) (**Fig. 3**). Die Konstrukte MCRsal und MCRst scheinen eine doppelte Cofaktorpräferenz aufzuweisen und zeigten etwa 40 - 50 % relative NADH-Aktivität im Vergleich zu derjenigen, die an NADPH gemessen wurde. MCRst ist möglicherweise hinsichtlich der spezifischen Aktivität das aktivste Enzym der vier getesteten Archaeen-MCRs, da es ein relativ hohes Aktivitätsniveau bei einem relativ niedrigen Expressionsniveau zeigte.

Beispiel 4: Produktion von 3-HP durch Kultivieren einer rekombinanten Hefe Kultivierung von *S. cerevisiae* im Schüttelkolben

[0102] Eine kleine Zellschleife wurde aus Stämmen entnommen, die frisch auf Platten gezüchtet worden waren, die auf selektivem Agar basierten, und wurden zum Inokulieren von 20 mL selektivem SC-basiertem Medium (20 g/L Glucose) in einem 250 mL-Kolben verwendet und 2 Tage gezüchtet (30 °C, 250 UpM), bis die gesamte Glucose und das gesamte Ethanol verbraucht waren. Die am Ende vorhandene Zelldichte wurde gemessen, und die Kulturen wurden 5 min mit 4000 UpM zentrifugiert. Die Überstände wurden dann mittels HPLC oder GC/MS analysiert, um die Akkumulation von 3-HP und anderen Hauptmetaboliten in den Kulturüberständen zu bestimmen. Es wurden jedoch je nach speziellem Stamm und Ziel (z. B. Ausgangsmenge an Glucose, Menge der Belüftung, Typ des Mediums und Zusatz von zusätzlichen Substanzen zu dem Medium, usw.) auch andere Kultivierungsbedingungen getestet.

Beispiel 5: Kultivierung von *S. cerevisiae* im Bioreaktor

[0103] Kulturen wurden in Multifors-Bioreaktoren (maximales Arbeitsvolumen 500 mL, 2 4-schaufelige Rushton- Turbinenlaufräder, Infors HT, Schweiz) durchgeführt, die 250 - 500 mL Medium enthielten. Die Kulturen wurden auf 30 °C, 300 oder 900 - 950 UpM mit anfangs 1,2, 2,4 oder 3,6 Volumina Gas (Volumenkultur)⁻¹ min⁻¹ (VVM) gehalten. Der pH-Wert der Kultur wurde durch Zugabe von steriler 2 M NaOH oder 2 M H₃PO₄ auf pH 5,5 ± 0,2 konstant gehalten. Clerol FBA 3107 Antischaum (Cognis France, Ponthierry Paris, Frankreich; 0,03 % V/V) wurde zugegeben, um die Schaumproduktion zu kontrollieren. Die Gaskonzentration (CO₂, O₂, N₂ und Ar) wurde kontinuierlich in einem Prima Pro Process Massenspektrometer (Thermo Scientific, UK) analysiert, das mit 3 % CO₂ in Ar, 5 % CO₂ mit 0,99 % Ar und 15 % O₂ in N₂, 20 % O₂ plus 20 % Ar in N₂ sowie 0,04 % Ethanol in N₂ kalibriert worden war.

[0104] Die Stämme wurden über Nacht in geschüttelten Kolben in SCD-basiertem selektivem Medium vorgezüchtet und zum Inokulieren der Bioreaktoren verwendet.

[0105] Die Chargenphase der Kulturen (20 g/L Anfangsglucose) wurde 14 bis 20 h weitermachen gelassen, und die Glucosezufuhr wurde erst gestartet, nachdem die Glucose verbraucht worden war, aber entweder nach oder bevor Ethanol verbraucht worden war (je nach Zielsetzung der Kultivierung). Die Glucosezufuhr rate wurde auf 0,38 - 0,65 g L⁻¹ h⁻¹ gehalten (je nach Zielsetzung der Kultivierung). Überstandproben wurden dann mittels HPLC analysiert, um die Akkumulation von 3-HP und anderen Hauptmetaboliten in den Kulturen zu bestimmen.

Beispiel 6: 3-HP -Analyse aus Zellkulturüberständen mittels HPLC

[0106] Die Kulturüberstandproben wurden mit dem Waters Alliance e2695 HPLC-System (Waters, Milford, USA) analysiert, wobei das Injektionsvolumen 10 µl betrug. Als stationäre Phase wurde in der HPLC eine Aminex HPX-87H Organic Acid Column (Säule für organische Säure) (300 mm × 7,8 mm) (Bio-Rad, USA) verwendet, die an eine Fast Acid Analysis Column (schnelle Säureanalysensäule) (100 mm × 7,8 mm) (Bio-Rad, USA) gekoppelt war. Die Säulen wurden auf +55 °C gehalten, und als Eluierungsmittel wurde 5,0 mM H₂SO₄ (Merck KGaA, Deutschland) mit der Flussrate von 0,3 oder 0,5 ml min⁻¹ verwendet. Zur Detektierung von 3-Hydroxypropionsäure, Glucose, Acetat, Succinat, Pyruvat, Glycerin und Ethanol wurden ein Waters 2489 Dualwellenlängen-UV (210 nm)-Detektor (Waters, Milford, USA) und ein 2414 Differentialrefraktometer (Waters, Milford, USA) verwendet.

Beispiel 7: 3-HP -Analyse aus Zellkulturüberständen mittels GC/MS

[0107] Die Testproben und Standardkurve wurden auf folgende Weise vorbereitet: Überstand (0,5 ml) wurde mit 50 µl of HCl (6N) angesäuert und mit 3-HPA (TCI) Standard (in Ethylacetat) versetzt. 5 µl der Milchsäurelösung als interner Standard (Sigma Aldrich (ISOTEC) Natrium-L-lactat-3,3,3-d₃ 98 Atom %; 5,5 g/l) und

ungefähr 0,2 g NaCl wurden zugefügt. Da markierte 3-HP nicht im Handel erhältlich ist, wurde dieses Milchsäureprodukt mit stabilem Isotop als interner Standard verwendet, da es die erhältliche Verbindung war, die 3-HP strukturell/chemisch am ähnlichsten war, die nicht in der Probenmatrix vorhanden ist. Die Mischung wurde in einem Vortex-Mischer ungefähr 3 Minuten geschüttelt. Die Probe wurde dann zwei Mal mit 0,5 ml Ethylacetat extrahiert, indem sie ungefähr 3 Minuten in einem Vortex-Mischer gemischt wurde. Die Phasen wurden getrennt, indem 5 Minuten lang mit 10000 UpM zentrifugiert wurde. Die oberen Phasen wurden in einem GC-Vial aufgefangen und eingedampft. Die getrockneten Rückstände wurden mit MSTFA (50 µl), das 1 % TMCS enthielt, durch Inkubieren für 1 Stunde bei 60 °C derivatisiert. Die Standards für die Kalibrierkurve wurden in der gleichen Weise wie die Proben extrahiert, um Fehler zu minimieren.

[0108] Die Proben wurden mit einem Agilent 6890 Gaschromatographen (GC) kombiniert mit einem Agilent 5973 massenselektiven Detektor (MSD) vermessen. Die Injektor- (Injektionsvolumen 1 µl Teilungsverhältnis 20:1) und MSD-Schnittstellentemperaturen waren 280 °C, und das Ofentemperaturprogramm war 50 °C bis 280 °C mit einer Rate von 20°C/min. Die Analysen wurden an einer Agilent HP-5MS Kapillarsäule (30 m, ID 200 µm, Filmdicke 0,25 µm; Agilent 19091S-433) durchgeführt. Die Identifikationen der Verbindungen basierten auf einer Spektralsuche aus der NIST-Bibliothek. 3-HP wurde durch Überwachen von m/z 147 und m/z 219 detektiert, und 3-HP-Dimer wurde durch Überwachen von m/z 177 detektiert. Es wurden Fünfpunkt-Kalibrierkurven (c = 1 - 400 mg/l) unter Verwendung der 3-HP-Reaktionen konstruiert, und zur Normalisierung wurde ein interner Standard genutzt. Die Quantifizierung erwies sich in diesem Konzentrationsbereich als linear. Zusammen mit den Proben wurden Blindproben analysiert.

Beispiel 8: Beurteilung von *S. cerevisiae* Plasmidexpressionsstämmen

[0109] Die 3-HP-Plasmidexpressionsstämme exprimierten gleichzeitig ein, zwei oder drei Enzyme des 3-HP-Stoffwechselwegs (d.h. AADH, ACC1, MCR und HPDH) aus zwei unterschiedlichen Expressionsplasmiden (d.h. pSK-084 und/oder pSK-085) (**Fig. 4**). Diese Stämme wurden verwendet, um die Auswirkungen der unterschiedlichen Enzyme des 3-HP-Stoffwechselwegs (und Kombinationen dieser Enzyme) auf die Produktion von 3-HP in dem VSK-128 säuretoleranten *S. cerevisiae* Stamm zu beurteilen. Die Stämme wurden in 20 mL selektivem SC-basierendem Medium (20 g/L Glucose) in 250 mL Kolben kultiviert und 2 Tage (30 °C, 250 UpM) gezüchtet, bis die gesamte Glucose und das gesamte Ethanol verbraucht worden waren.

Beispiel 9: Zusammenfassung der in vivo-Aktivitätsanalysen der Enzyme des Stoffwechselwegs

[0110] Fünfundzwanzig AADHs, 8 ACC1s, 10 bifunktionale HPDH-MCRs, 6 Archaeen-MCRs und 28 HPDHs in Tabelle 16 wurden auf ihre Fähigkeit zur Produktion von 3-HP in verschiedenen *S. cerevisiae* Stämmen analysiert, die nach Bedarf auch zusätzliche Enzyme des 3-HP-Stoffwechselwegs exprimierten. Es wurde gezeigt, dass viele neue Enzyme des 3-HP-Stoffwechselwegs (erhalten aus Genome Mining-Analysen) in Hefe aktiv waren und viele von ihnen hervorragende Eigenschaften besaßen (d. h. höhere Aktivitäten, bessere Cofaktorpräferenz), verglichen mit zuvor veröffentlichten Enzymen des 3-HP-Stoffwechselwegs.

[Tabelle 16]

Typ	Genabkürzung	SEQ ID NRn.
Gene, die für AADHs	AADHab	SEQ ID NO:3

Typ	Genabkürzung	SEQ ID NRn.
kodieren	AADH _{al}	SEQ ID NO:4
	AADH _{bs}	SEQ ID NO:5
	AADH _{bw}	SEQ ID NO:6
	AADH _{cs}	SEQ ID NO:7
	AADH _{ho}	SEQ ID NO:8
	AADH _{hs}	SEQ ID NO:9
	AADH _{ma1}	SEQ ID NO:10
	AADH _{ma2}	SEQ ID NO:11
	AADH _{mm}	SEQ ID NO:12
	AADH _{pa}	SEQ ID NO:13
	AADH _{pb}	SEQ ID NO:14
	AADH _{pe}	SEQ ID NO:15
	AADH _{rw}	SEQ ID NO:16
	AADH _{sl}	SEQ ID NO:17
	AADH _{ss}	SEQ ID NO:18
	AADH _{ta}	SEQ ID NO:19
	AADH _{tl}	SEQ ID NO:20
	AADH _{tm}	SEQ ID NO:21
	AADH _{vs}	SEQ ID NO:22
	ADH _{Eec}	SEQ ID NO:23
	AH _{Epm}	SEQ ID NO:24
	EUT _{Edz}	SEQ ID NO:25
	EUT _{Eec}	SEQ ID NO:26
	LIN1129li	SEQ ID NO:27
Gene, die für ACC1s kodieren	ACC1 _{sc_S659A}	SEQ ID NO:28
	ACC1 _{sc_S659A/S1157A}	SEQ ID NO:29
	ACC1 _{sc_S1157A}	SEQ ID NO:30
	ACC1 _{ke}	SEQ ID NO:31
	ACC1 _{mc}	SEQ ID NO:32
	ACC1 _{sc}	SEQ ID NO:33
	ACC _{yl}	SEQ ID NO:34
	ACC1 _{ch}	SEQ ID NO:35

Typ	Genabkürzung	SEQ ID NRn.
Gene, die für bifunktionale HPDH-MCRs kodieren	HPDH-MCRbs	SEQ ID NO:36
	HPDH-MCRca	SEQ ID NO:37
	HPDH-MCRcag	SEQ ID NO:38
	HPDH-MCRct	SEQ ID NO:39
	HPDH-MCRgb	SEQ ID NO:40
	HPDH-MCRot	SEQ ID NO:41
	HPDH-MCRrc	SEQ ID NO:42
	HPDH-MCRsl	SEQ ID NO:43
	HPDH-MCRca_variant_3	SEQ ID NO:44
	HPDH-MCRca_variant_6	SEQ ID NO:45
Gene, die für HPDHs kodieren	BDHcm	SEQ ID NO:46
	BDHkp	SEQ ID NO:47
	HBDHos	SEQ ID NO:48
	HBDHps	SEQ ID NO:49
	HIBADHas	SEQ ID NO:50
	HIBADHbc	SEQ ID NO:51
	HIBADHma	SEQ ID NO:52
	HIBADHpa	SEQ ID NO:53
	HIBADHxc	SEQ ID NO:54
	HPDHam	SEQ ID NO:55
	HPDHbs	SEQ ID NO:56
	HPDHca	SEQ ID NO:57
	HPDHcag	SEQ ID NO:58
	HPDHct	SEQ ID NO:59
	HPDHec	SEQ ID NO:60
	HPDHed	SEQ ID NO:61
	HPDHgb	SEQ ID NO:62
	HPDHhw	SEQ ID NO:63
	HPDHka	SEQ ID NO:64
	HPDHms	SEQ ID NO:65
	HPDHot	SEQ ID NO:66
	HPDHps	SEQ ID NO:67
	HPDHra	SEQ ID NO:68
	HPDHrc	SEQ ID NO:69
	HPDHsi	SEQ ID NO:70
	HPDHsl	SEQ ID NO:71
	HPDHsm	SEQ ID NO:72
	HPDHst	SEQ ID NO:73

Beispiel 10: Schüttelkolben-Kulturversuche mit *S. cerevisiae* zur Produktion von 3-HP

Kultivierungsbedingungen

[0111] An einigen frühen Teststämmen wurden verschiedene unterschiedliche Kultivierungsbedingungen beurteilt, um zu sehen, wie die verschiedenen Kulturbedingungen die Fähigkeit des Stamms beeinflussten, 3-HP zu produzieren. Der Stamm *S. cerevisiae* VSK-128 (Δ ura3, Δ his3) exprimiert zwei Plasmide, wobei eines der Plasmide entweder das HIBADHpa oder das HPDHec Gen enthielt, und das zweite Plasmid enthielt das MCRsa2 Gen. Beide Stämme verhielten sich während der Kultivierungen ähnlich und hatten sehr ähnliche Metabolitenprofile.

[0112] Es wurden sechs unterschiedliche Kultivierungsbedingungen in Schüttelkolben getestet:

1. Aerob, Chargenprozess, hohe Anfangsglucose (120 g/L). An Tag 3 wurden weitere 100 g/L Glucose zugefügt.
2. Anaerob, Chargenprozess, hohe Anfangsglucose (100 g/L). Die Kolben wurden versiegelt, und das Schütteln war mit 100 UpM langsamer.
3. Aerob, Chargenprozess, wiederholtes Versetzen mit Glucose Anfangsglucose war 20 g/L, danach wurden an jedem Folgetag 40 g/L zugegeben.
4. Aerob, simulierter gefütterter Chargenprozess, viele Anfangsglucosetabletten. Anfangs wurden 5 Tabletten zugegeben, weitere 5 Tabletten wurden an Tag 3 zugegeben. Täglich wurden verschiedene Mengen an Enzym A Lösung (50 - 150 μ l pro Tag) zugegeben.
5. Aerob, simulierter gefütterter Chargenprozess, wiederholtes Versetzen mit Glucosetabletten. 1 Tablette wurde anfangs zugegeben, 2 Tabletten wurden an den Tagen 1 und 2 zugegeben, 3 Tabletten wurden an den Tagen 3 und 4 zugegeben. Täglich wurden verschiedene Mengen an Enzym A Lösung (50 - 150 μ l pro Tag) zugegeben.
6. Aerob, Chargenprozess, wiederholtes Versetzen mit Galactose. Anfangsgalactose war 20 g/L, danach wurden an jedem Folgetag 40 g/L zugegeben.

[0113] Es wird bei den simulierten gefütterten Chargenkultivierungen angenommen, dass jede Tablette 0,5 g Glucose freisetzt (was 20 g/L Glucose in unseren Kulturvolumina von 25 ml entspricht). Die Tabletten bestehen im Wesentlichen aus Glucose (d.h. Stärke) und einer Enzym A Lösung (d. h. Amylase), wodurch während der Kultivierungen im Schüttelkolben die kontrollierte langsame Freisetzung von Glucose in das Medium möglich ist. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Glucose-limitierte gefütterte Chargenbedingungen den Wandel zu Wachstum hin und anschließend zur 3-HP-Produktion begünstigen können.

Zellwachstum

[0114] Alle der regulären Glucose-basierten Kultivierungen wuchsen in ähnlicher Weise, und die mit Galactose gefütterte Kultivierung wuchs langsamer. Die Bedingungen der gefütterten Charge begünstigten andererseits mehr Zellwachstum, verglichen mit den anderen Kultivierungsbedingungen. Die Bedingungen der gefütterten Charge (Versetzen mit Tabletten) begünstigten insbesondere ein starkes Wachstum früh in der Kultivierung.

3-HP-Produktion

[0115] Der überwiegende Teil des Wachstums war bei diesen Kultivierungen allgemein bis zum Ende von Tag 2 aufgetreten, und der wesentliche Hauptteil von 3-HP war auch bis Tag 2 produziert worden, was anzeigt, dass Wachstum und 3-HP-Produktion miteinander verknüpft sind. Die Kultivierungsbedingungen der gefütterten Charge (Versetzen mit Tabletten) produzierte die meiste 3-HP (~0,85 g/L), und die mit Galactose gefütterten Kultivierungen produzierten die geringste Menge an 3-HP (~0,12 g/L), und die anderen Kultivierungsbedingungen produzierten alle etwa 0,3 bis 0,4 g/L 3-HP. Diese Ergebnisse zeigen, dass Kultivierungsbedingungen eine große Wirkung auf die 3-HP-Produktionsniveaus (**Fig. 5**) haben können.

Glucoseverbrauch

[0116] Glucose wurde in allen der Kultivierungsversuche bis zu den Tagen 2 - 3 rasch verbraucht, danach sanken die Glucoseverbrauchsraten signifikant (während der Tage 4 - 5) zusammen mit Wachstum und 3-

HP-Produktion. Bei den Kultivierungen der gefütterten Charge schien Glucose so rasch konsumiert zu werden, wie sie aus den Tabletten freigesetzt wurde, was nahelegt, dass diese Kultivierungen unter Glucoselimitierten Bedingungen durchgeführt wurden.

Akkumulation von Glycerin, Acetat und Ethanol

[0117] Die Akkumulation von Glycerin war für die mit Glucose gefütterten Kultivierungen recht hoch und für die mit Galactose gefütterten Kultivierungen viel niedriger. Die Acetatakkumulation war unter den unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen recht ähnlich, die Bedingungen mit gefütterter Charge (viele Tabletten) produzierten jedoch mehr Acetat.

[0118] In den meisten dieser Kultivierungen im Schüttelkolben sammeln sich große Mengen an Ethanol an, insbesondere in den Glucose-Chargenkultivierungen und den Kultivierungen mit Versetzen mit Glucose. Die gefütterten Chargenkultivierungen zielten darauf, Glucose-limitierte Bedingungen zu repräsentieren, um Überflussmetabolismus zu reduzieren, und dieser Ansatz scheint erfolgreich gewesen zu sein, da die Ethanolakkumulation in den gefütterten Chargenkultivierungen signifikant niedriger war.

Kultivierung eines etablierteren 3-HP-Produktionsstamms

[0119] Ein zusätzlicher 3-HP-Produktionsstamm [(EutEec, HPDH-MCRca, ACC1sc_S1157A) und (HIBADHpa, MCRsa2)] wurde gemäß den vielversprechendsten Kultivierungsbedingungen mit gefütterter Charge (Versetzen mit Tabletten) kultiviert, um seine Leistung zu prüfen.

[0120] Das meiste des Wachstums hatte wiederum bis zum Tag 3 stattgefunden, und die meiste 3-HP-Produktion hatte bis zum Tag 3 stattgefunden. Unter diesen Kultivierungsbedingungen übertraf die 3-HP-Produktion bei diesem Stamm 1,2 g/L, (Fig. 6).

[0121] Obwohl konkrete Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung detailliert beschrieben sind, wird es für Fachleute offensichtlich sein, dass die konkrete Beschreibung sich lediglich auf erwünschte beispielhafte Ausführungsformen bezieht und nicht als den Umfang der vorliegenden Erfindung einschränkend angesehen werden sollte. Der wesentliche Umfang der vorliegenden Erfindung ist daher durch die angefügten Ansprüche und deren Äquivalent definiert.

Industrielle Anwendbarkeit

[0122] Die Verwendung der rekombinanten Hefe und des Verfahrens zur Herstellung von 3-HP der vorliegenden Erfindung ermöglicht die Produktion von 3-HP in einer hohen Konzentration und einer hohen Ausbeute bei einem niedrigen pH-Wert aus einem brauchbaren Zucker, wie Glucose, wodurch zur wirtschaftlichen Produktion von 3-HP aus Biomasse und deren angewandten Produkten wesentlich beigetragen wird.

Es folgt ein Sequenzprotokoll als elektronisches Dokument. Dieses kann sowohl in DEPATISnet als auch im DPMAregister aufgerufen werden.

Patentansprüche

1. Rekombinante Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, umfassend einen aktiven Stoffwechselweg zur Biosynthese von 3-HP gemäß [Pyruvat → Acetaldehyd → Acetyl-CoA → Malonyl-CoA → Malonatsemialdehyd → 3-HP], wobei die Hefe umfasst:
 ein exogenes Gen, das für AADH kodiert, mit einer Aminosäuresequenz ausgewählt aus SEQ ID Nos: 145-176;
 ein endo- oder exogenes Gen, das für ACC kodiert, mit einer Aminosäuresequenz ausgewählt aus SEQ ID Nos: 99-106;
 ein exogenes Gen, das für MCR kodiert, mit einer Aminosäuresequenz ausgewählt aus SEQ ID Nos: 192-207 und
 ein exogenes Gen, das für HPDH kodiert, mit einer Aminosäuresequenz ausgewählt aus SEQ ID Nos: 127-130, 132-133, 137, 140, 142 und 208-275.

2. Rekombinante Hefe nach Anspruch 1, wobei die MCR dahingehend bifunktional ist, dass die MCR gleichzeitig eine Funktion zum Umwandeln von Malonyl-CoA in Malonatsemialdehyd und eine Funktion zur Umwandlung von Malonatsemialdehyd in 3-HP hat.

3. Rekombinante Hefe nach Anspruch 1, wobei die MCR dahingehend monofunktional ist, dass sie eine Funktion zum Umwandeln von Malonyl-CoA in Malonatsemialdehyd hat; und ferner ein Gen umfasst, welches für ein Enzym kodiert, das Malonat-semialdehyd in 3-HP umwandeln kann.

4. Rekombinante Hefe nach Anspruch 1, wobei die Hefe säurebeständig ist.

5. Verfahren zum Herstellen von 3-HP, umfassend:

(a) Kultivieren der rekombinanten Hefe nach einem der Ansprüche 1 bis 4 in einem Medium, das mindestens eine Kohlenstoffquelle einschließt, wodurch 3-HP produziert wird; und

(b) Isolieren von 3-HP aus der Kultur.

6. Verfahren zum Herstellen von 3-HP nach Anspruch 5, wobei die Kohlenstoffquelle eine oder mehrere ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Glucose, Xylose, Arabinose, Saccharose, Fructose, Galactose, Cellulose, Glucoseoligomeren und Glycerin ist.

7. Verfahren zum Herstellen von 3-HP nach Anspruch 5, wobei das Kultivieren bei einem pH-Wert im Bereich von 2,6 bis 4,0 durchgeführt wird.

Es folgen 5 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

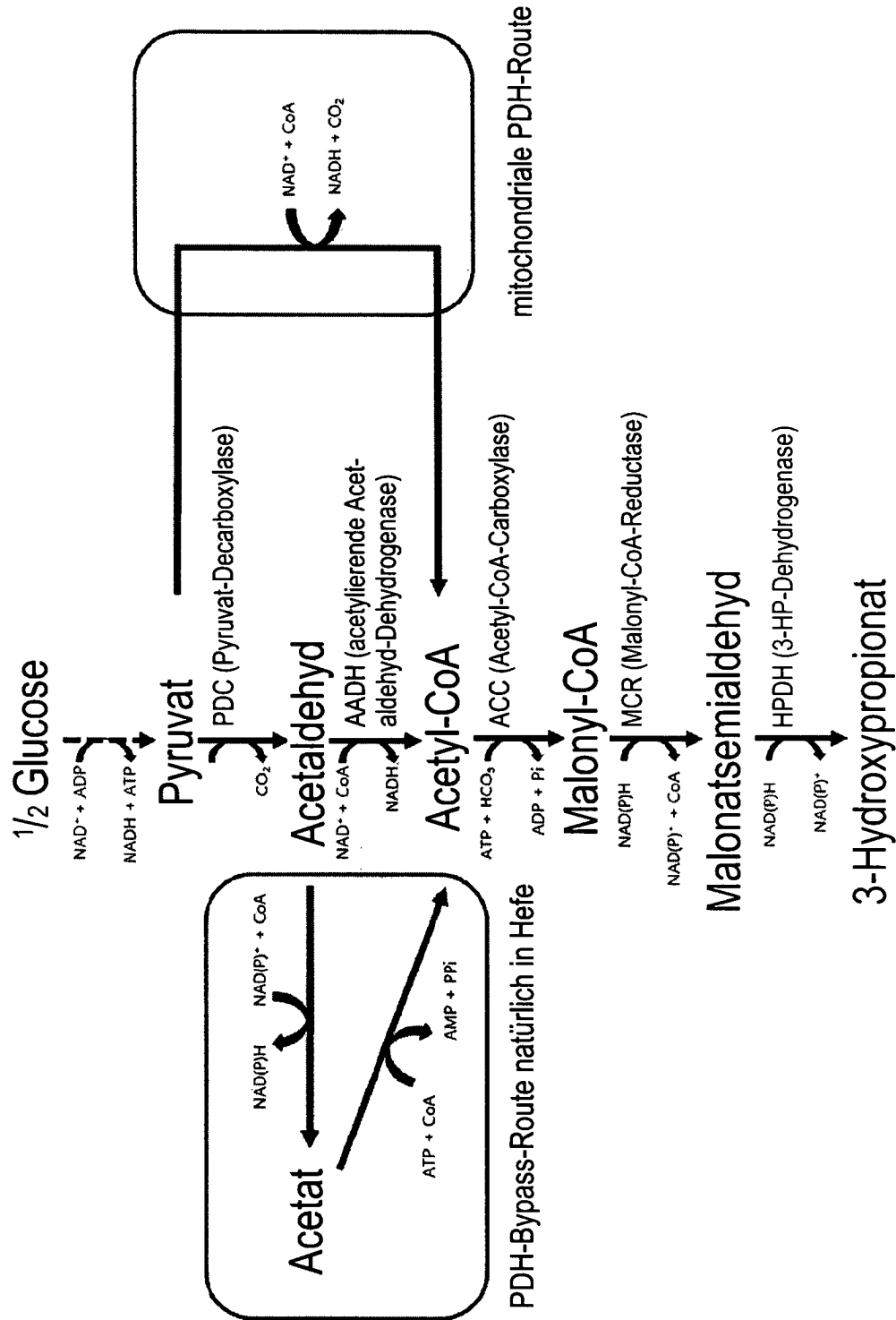


Fig. 1

ACC1ch < ACCmc < ACCsc S659A < ACCsc < ACCsc S1157A ~
ACCsc S659A/S1157A < ACCke < ACCyl

Fig. 2

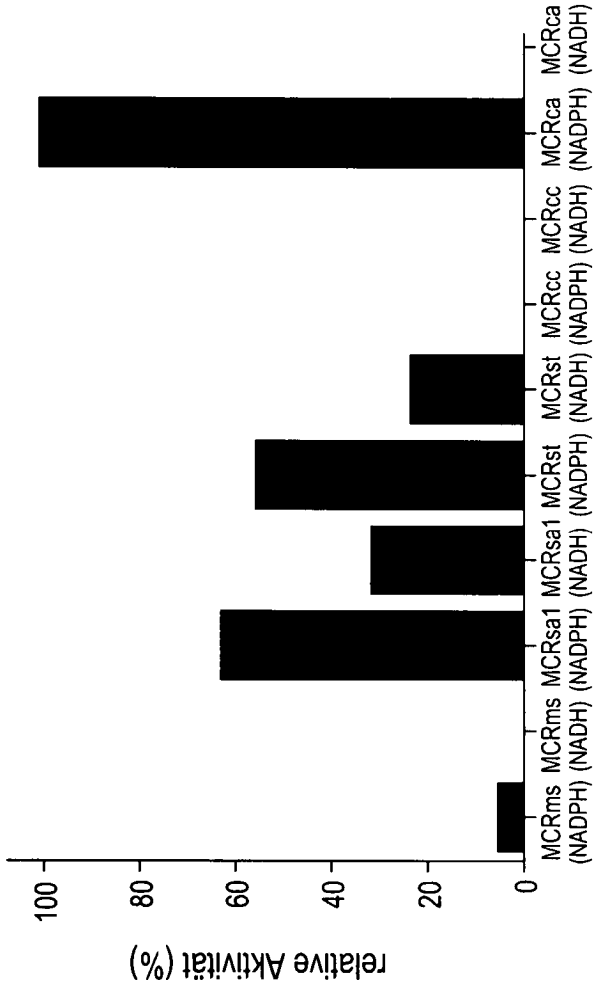
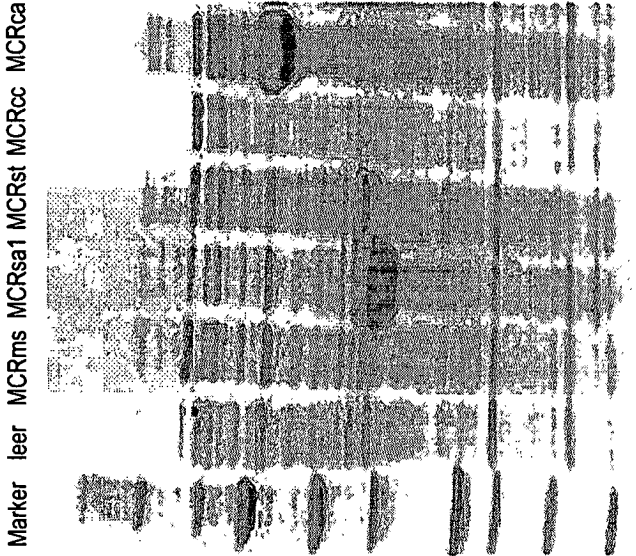


Fig. 3



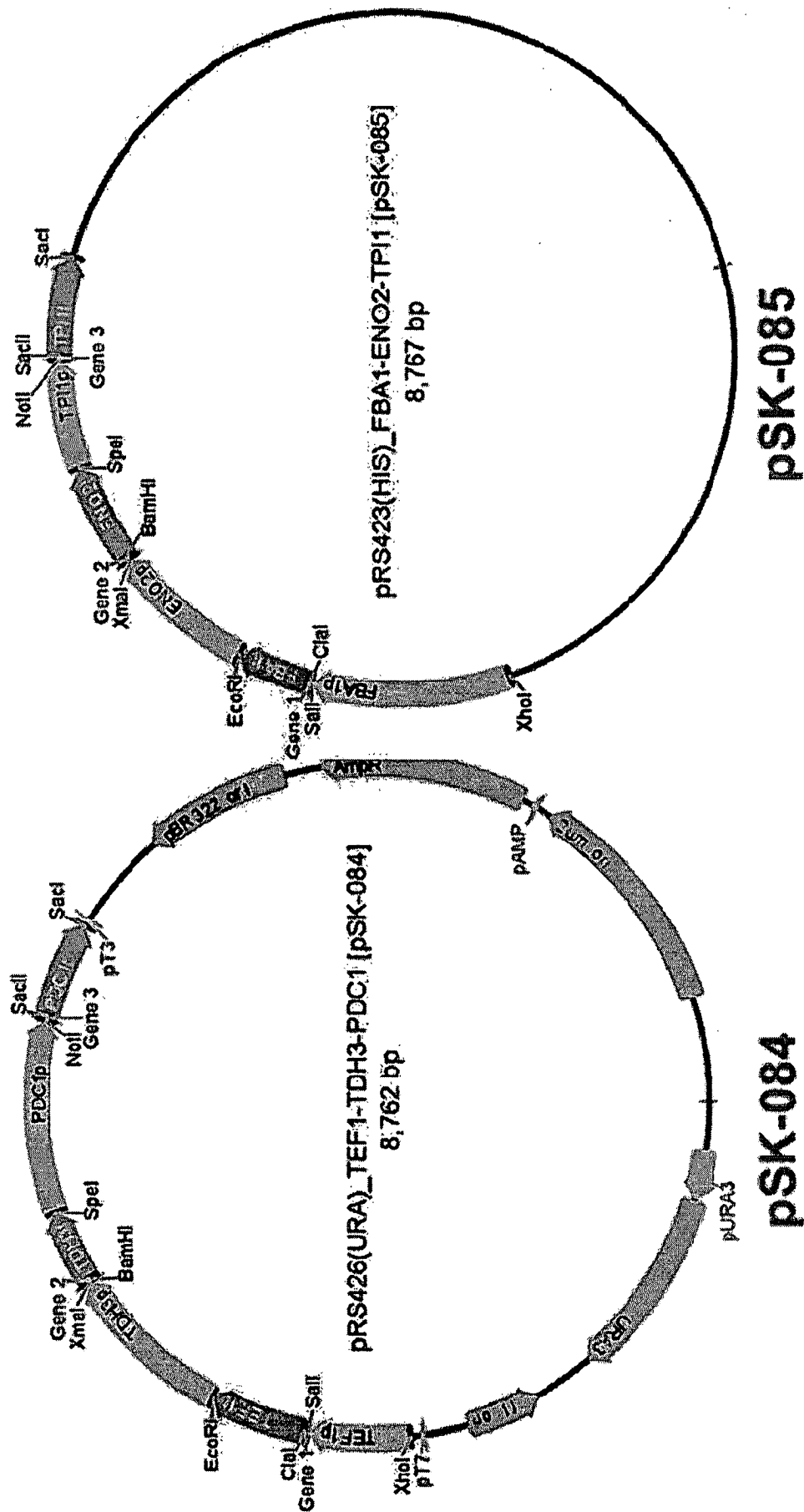


Fig. 4

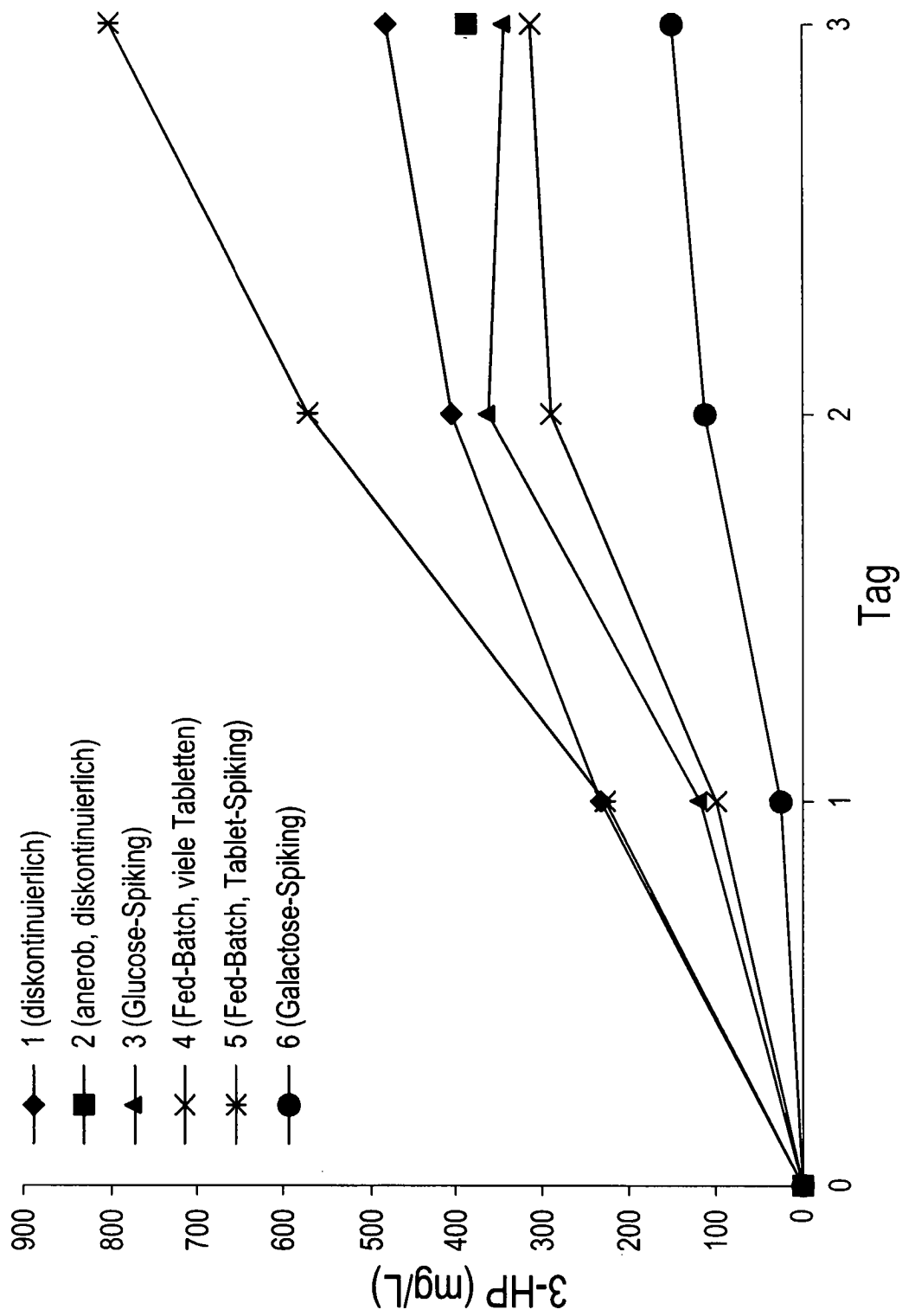


Fig. 5

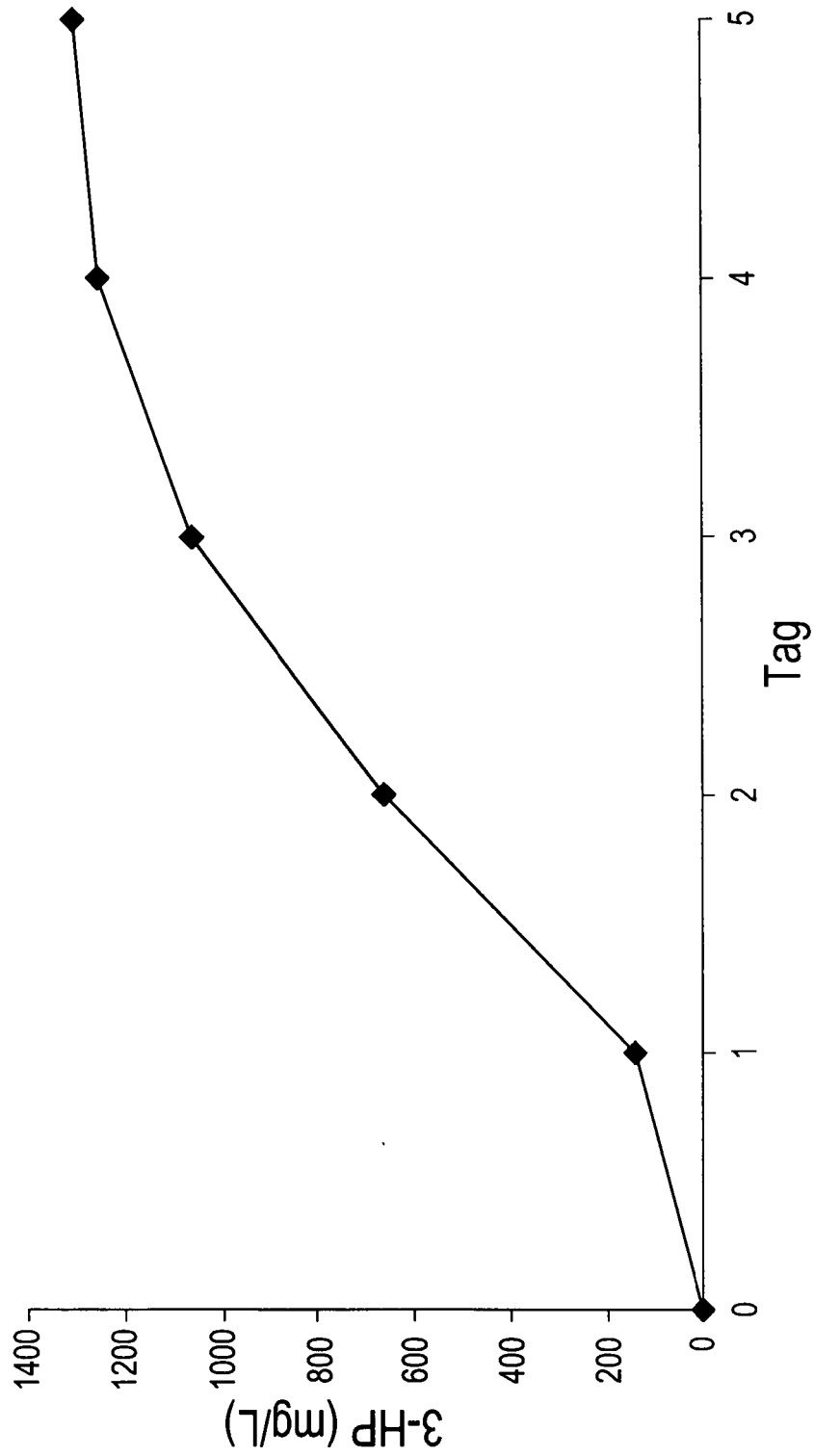


Fig. 6