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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
3. Dezember 2015 (03.12.2015)

WIPO | PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2015/180993 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12P 23/00 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2015/060924

(22) Internationales Anmeldedatum:
19. Mai 2015 (19.05.2015)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2014 210 308.8 30. Mai 2014 (30.05.2014) DE

(71) Anmelder: **WACKER CHEMIE AG** [DE/DE]; Hanns-Seidel-Platz 4, 81737 München (DE).

(72) Erfinder: **MITTERWEGER, Simone**; Am Hang 2a, 82205 Gilching (DE). **RAAB, Andreas**; Ilsenburgerstr. 13, 10589 Berlin (DE). **SCHILLING, Michael**; Erich-Weinert-Str. 130, 10409 Berlin (DE).

(74) Anwälte: **POTTEN, Holger** et al.; Wacker Chemie AG, Hanns-Seidel-Platz 4, 81737 München (DE).

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

(84) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)*

— *mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)*

WO 2015/180993 A1

(54) **Title**: YEAST STRAIN FOR PRODUCING CAROTENOIDS

(54) **Bezeichnung** : HEFESTAMM ZUR PRODUKTION VON CAROTINOIDEN

(57) **Abstract**: The invention concerns a yeast strain of the Saccharomyces genus with an established carotenoid biosynthesis pathway, characterised in that it can overexpress a PDR1 gene or PDR1 homologue.

(57) **Zusammenfassung**: Hefestamm der Gattung Saccharomyces mit etabliertem Carotinoidbiosyntheseweg, dadurch gekennzeichnet, dass er ein PDR1 Gen oder PDR1-Homolog überexprimieren kann.

Hefestamm zur Produktion von Carotinoiden

Die Erfindung betrifft einen Hefestamm zur Produktion von Carotinoiden, Verfahren zu seiner Herstellung sowie seine Verwendung zur Herstellung von Carotinoiden.

Der Begriff "Carotinoid" bezieht sich auf eine strukturell diverse Klasse von Pigmenten, die vom Isoprenoid Biosynthese Weg abstammen. Der erste wichtige Schritt bei der Carotinoid Biosynthese ist die Entstehung von Phytoen aus Geranyl-geranyl-Pyrophosphat. Carotinoide können cyclisch oder azyklisch sein und können oder können keinen Sauerstoff enthalten, so dass der Begriff Carotinoide sowohl Carotene als auch Xanthophylle einschliesst.

Im Allgemeinen sind Carotinoide Kohlenwasserstoff Verbindungen, die ein konjugiertes Polyen Kohlenstoff Gerüst haben, das aus Isopentenylpyrosphat Phosphat entstanden ist. Hier enthalten sind Triterpene und Tetraterpene, sowie deren oxigenierten Derivate und andere Verbindungen mit Längen von z.B. C35, C50, C60, C70, C80. Viele Carotinoide haben starke lichtabsorbierende Eigenschaften und können in der Länge größer C200 sein.
C30 Diapocarotinoide bestehen typischerweise aus sechs Isopren Einheiten, die so verbunden sind, dass die Anordung der Isopreneinheiten in der Mitte des Moleküls invertiert ist und dass die zwei zentralen Methylgruppen in einem 1,6-positionalen Verhältnis und die verbleibenden nicht-terminalen Methylgruppen in einem 1,5-positionalen verhältnis stehen. Solche C30 Carotinoide können aus einer azyklischen C30H42 Struktur hervorgegangen sein, die eine lange zentrale Kette aus konjugierten Doppelbindungen haben, z.B. durch Hydrogenierung, Dehydrogenierung, Cyclisierung, Oxidation, Veresterung, Glykosilierung oder eine Kombination dieser Prozesse.
C40 Carotinoide bestehen typischerweise aus acht Isopren Einheiten die auf solche Weise verbunden sind, dass die Anordung der Isopreneinheiten in der Mitte des Moleküls invertiert ist und dass die zwei zentralen Methylgruppen in

einem 1,6-positionalen Verhältnis und die verbleibenden nicht-terminalen Methylgruppen in einem 1,5-positionalen verhältnis stehen. Solche C40 Carotinoide können aus einer azyklischen C40H42 Struktur hervorgegangen sein, die eine lange zentrale kette aus konjugierten Doppelbindungen haben, z.B. durch Hydrogenierung, Dehydrogenierung, Cyclisierung, Oxidation, Veresterung, Glykosilierung oder eine Kombination dieser Prozesse. Die Klasse der C40 Carotinoide enthält auch bestimmte Verbindungen, die aus einer Umlagerung des Kohlenstoffgerüsts hervorgehen oder aus einem Entfernen von Teilen dieser Struktur. Mehr als 600 verschiedene Carotinoide wurden in der Natur identifiziert; Carotinoide beinhalten unter anderem: Antheraxanthin, Adonirubin, Adonixanthin, Astaxanthin, Canthaxanthin, Capsorubrin, [beta]-Cryptoxanthin, [alpha]-Carotin, [beta]-Carotin, [beta],[psi]- Carotin, [delta]-Carotin, [epsilon]-Carotin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, [gamma]- Carotin, [psi]-Carotin, 4-keto-[gamma]-Carotin, [zeta]-Carotin, [alpha]-Cryptoxanthin, Deoxyflexixanthin, Diatoxanthin, 7,8-Didehydroastaxanthin, Didehydrolycopene, Fucoxanthin, Fucoxanthinol, Isorenieratene, [beta]-Isorenieratene, Lactucaxanthin, Lutein, Lycopin, Myxobacton, Neoxanthin, Neurosporen, Hydroxyneurosporen, Peridinin, Phytoen, Rhodopin, Rhodopin glucoside, 4- Keto-rubixanthin, Siphonaxanthin, Spheroidene, Spheroidenone, Spirilloxanthin, Torulene, 4- Keto-torulene, 3-Hydroxy-4-keto-torulene, Uriolide, Uriolide acetat, Violaxanthin, Zeaxanthin-[beta]-diglucosid, Zeaxanthin und C30 Carotinoide. Zusätzlich enthalten Carotinoide Derivate von diesen Molekülen, die Hydroxy-, Methoxy-, Oxo-, Epoxy-, Carboxy-, oder Aldehyd Gruppen enthalten können. Des weiteren sind Ester(z.B. Glykosid Ester, Fettsäureester) und Sulfat Derivate eingeschlossen (z.B. veresterte Xanthophylle). Sie dienen als Antioxidantien für den Membranschutz, indem sie Sauerstoff- und Peroxid Radikale abfangen. Ihre antioxidative Eigenschaft ist ihrer Struktur zuzuschreiben. Carotinoide gehören zu einem der wichtigsten Bestandteile in Lebensmitteln. Sie sind natürliche Farbstoffe, wie z.B. Gelb oder Rot, wodurch sie einen großen Einfluss auf die Akzeptanz vieler Lebensmittel haben. Darüber hinaus sind

einige Carotinoide Vorstufen von Vitamin A. Carotinoide weisen häufig eine gesundheitsfördernde Wirkung auf, indem sie gegen Krankheiten wie Krebs, Herzkreislauf-Erkrankungen, Makula-Degeneration oder Grauen Star vorbeugen können.

Das Interesse an Carotinoiden hat in den letzten Jahren deutlich zugenommen, vorwiegend aufgrund ihres gesundheitlichen Nutzens, aber auch aufgrund des Wachsens von verschiedenen Märkten oder Bereichen. Dazu gehört die Landwirtschaft, vor allem die Aquakultur und Geflügelindustrie, die Nahrungsergänzungsmittelindustrie, die Lebensmittelindustrie, bei der Carotinoide als Farbstoffe für Wurst, Softdrinks oder Backwaren eingesetzt werden, sowie die Pharma oder Kosmetik Branche.

Carotinoide werden aus Isopren Vorstufen synthetisiert, von denen auch einige bei der Produktion von Steroiden oder Sterolen beteiligt sind. Der bekannteste Isopren Biosynthese Weg ist der sogenannte „Mevalonat Weg". Acetyl-CoA wird über Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) in Mevalonat umgewandelt. Mevalonat wird dann phosphoriliert und in Isopentenylpyrophosphat (IPP) umgewandelt. Nach der Isomerisierung von IPP in Dimethyl-allylpyrophosphat (DMAPP), wird nach drei aufeinanderfolgenden Isomerisierungsreaktionen mit IPP das 10-Kohlenstoff Molekül Geranyl Pyrophosphat (GPP), gefolgt von dem 15-Kohlenstoff Molekül Farneylpyrophosphat (FPP) und schliesslich dem 20-Kohlenstoff Molekül Geranylgeranyl Pyrophosphat (GGPP) gebildet. Enzyme, die in der Carotinoid Biosynthese beteiligt sind, sind unter anderem GGPP-Synthase (CrtE), Phytoen Synthase (CrtB), Phytoen -oder Desaturase (CrtI), Lycopene cyclase (crtY), Carotinoid ketolase (crtW), Carotinoid hydroxylase (CrtZ), Astaxanthin synthase (CrtS).

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein robuster, industriell bestens etablierter Produktionsorganismus, der gute Wachstumseigenschaften, ein breites Substratspektrum und eine außerordentliche Salz- und Osmotoleranz aufweist. Sie ist deshalb für eine biotechnologische Produktion im industriellen Maßstab be-

sonders geeignet. *S. cerevisiae* ist vollständig sequenziert, gut charakterisiert und sämtliche Werkzeuge zur genetischen Optimierung sind etabliert. Bei der Produktion von Lipiden bietet *S. cerevisiae* einen großen Vorteil weil sie in der Lage ist große Mengen an lipidischen Komponenten in inerter Form intrazellulär in Lipidpartikeln abzulegen, wodurch die Physiologie der Hefezelle weitestgehend unbeeinflusst bleibt. *S. cerevisiae* weist keine nativen Carotinoid-Biosynthesewege auf, produziert jedoch über den Mevalonatbiosyntheseweg sämtliche Terpene, welche die Grundbausteine der Carotinoide sind, wie Isopentenyl-Diphosphat, Dimethylallyl-Diphosphat, Geranyl-Diphosphat und Farnesyl-Diphosphat (siehe Figur 1).

In Ukibe, K. et al, 2009, Appl Environ Microbiol 75:7205-11 oder Verwaal, R. et al, Yeast 27:983-98 wurde bereits gezeigt, dass die Hefe *S. cerevisiae* prinzipiell in der Lage ist, Carotinoide zu synthetisieren, wenn Gene (bzw. Enzyme) des Carotinoid-Biosyntheseweges heterolog eingeführt werden.

Im Falle von Phytoen müssen die Enzyme GGPP-Synthase und Phytoen-Synthase eingeführt werden, für welche die entsprechenden Gene als *crtE* und *crtB* bezeichnet werden. Für die Produktion von Beta-Carotin ist die Expression weiterer Gene mit den Bezeichnungen *crtI* und *crtY* notwendig, welche die Enzyme Phytoen-Desaturase und Lycopen-Cyclase kodieren (Ukibe, K. et al, Applied and Environmental Microbiology. 2009, 75 (22), pp. 7205 - 7211; Verwaal, R. et al, Applied and Environmental Microbiology. 2007, 73 (13), pp. 4342 - 4350). Aus der Literatur ist auch ein bifunktionelles Enzym bekannt, welches zwei enzymatische Schritte katalysiert. Dies ist die Phytoen Synthase/Lycopene Cyclase aus *Xanthophyllomyces dendrorhous*, die durch das Gen *crtYB* kodiert ist. Dieses Enzym vereint die Aktivitäten der Gene *crtY* und *crtB*, so dass für die Synthese von Beta-Carotin neben dem Gen *crtYB* nur noch die Gene *crtE* und *crtI* exprimiert werden müssen. Für die Synthese von Zeaxanthin und beta-Cryptoxanthin ist zusätzlich noch die Expression des Gens *crtZ* notwendig. Die Synthese von Astaxanthin wird durch die zusätzliche Expression des Gens *crtW* erreicht (siehe Fig. 4).

In den genannten Studien wurden diese Gene aus der Basidiomyceten-Hefe *Xanthophyllomyces dendrorhous* in *S. cerevisiae* eingeführt, was zur Synthese von ß-Carotin, Zeaxanthin, Astaxanthin und weiteren Carotinoiden führte, allerdings noch in Mengen, die für die industrielle Produktion zu gering erscheinen.

Verwaal, R.et al, Yeast 27:983-98 zeigten, dass *S. cerevisiae* in der Lage ist, Carotinoide zu sekretieren. Als hierfür verantwortlich wurden Transportproteine identifiziert, welche im „Pleiotropic Drug Resistance" (PDR) - Netzwerk involviert sind. Allerdings wurden PDR Gene und ihr Einfluss auf den Carotinoidgehalt der Zellen in dieser Studie nicht untersucht.

„Multiple Drug Resistance", das in der Hefe dem „Pleiotropic drug response" entspricht, beschreibt das Phänomen, dass Zellen eine Resistenz gegenüber potentiell toxischen Molekülen aus der Umwelt haben bzw. entwickeln. Hierfür sind Transporter verantwortlich, die diese Substanzen wieder aus der Zelle hinausschleusen. Das PDR1 Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der den „Pleitropic drug Response" in der Hefe (yeastgenome.org) reguliert. PDR1 kodiert für den Zinkfinger Transkriptionsfaktor Pdr1p, der Regulator des „Pleitropic drug responses" in der Hefe ist. Pdr1p dient als transkriptioneller Aktivator und Repressor indem er an „Pleitropic drug response" Elemente (PDRE) bindet, die in den Promoterregionen von Zielgenen zu finden ist.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, einen Hefestamm zur Verfügung zu stellen, der Carotinoide in größeren Mengen produziert als bekannte Hefestämme und intrazellulär speichert.

Die Aufgabe wird gelöst, durch einen Hefestamm der Gattung *Saccharomyces* mit einem etablierten Carotinoidbiosyntheseweg, dadurch gekennzeichnet, dass er ein PDR1 Gen oder PDR1-Homolog überexprimieren kann.

Das *PDR1*-Gen ist vorzugsweise durch die Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO: 6 und das PDR1 Genprodukt Pdr1p vorzugsweise durch die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 7 charakterisiert. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind als PDR1-Homologe solche Gene aufzufassen, die für Proteine mit Pdr1p Funktion kodieren, die bei einer Analyse mit dem Algorithmus BLAST 2.2.1 (Altschul, Stephen; Gish, Warren; Miller, Webb; Myers, Eugene; Lipman, David (1990). "Basic local alignment search tool". Journal of Molecular Biology 215 (3): 403-410) eine Sequenzidentität von größer 80 % bevorzugt größer 90 % besonders bevorzugt größer 95 % zu SEQ ID NO: 7, aufweisen.

Somit sind als PDR1-Homologe auch Allelvarianten des PDR1-Gens zu verstehen, insbesondere funktionelle Varianten, die sich durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus SEQ ID NO: 6 ableiten, wobei die Pdr1p Aktivität des jeweiligen Genprodukts jedoch erhalten bleibt. Die Aktivität der PDR1 Homologen wird, ebenso wie die Aktivität des PDR1-Gens bestimmt über die Bestimmung der Erhöhung der Carotinoid Biosynthese in Stämmen in denen die Carotinoid Biosynthese etabliert wurde.

Besonders bevorzugt handelt es sich bei dem *PDR1* Gen bzw. dem PDR1 Homologen, um das für Hefe Kodon optimierte Gen PDR1 (SEQ ID NO: 6).

Im Sinne der vorliegenden Erfindung wird ein Gen als überexprimiert betrachtet, wenn der Level der Proteinaktivität des codierten Genproduktes um mindestens 5 % erhöht ist im Vergleich zu einem Hefestamm mit gleichem genetischen Hintergrund, der nicht genetisch modifiziert wurde, um das Protein zu exprimieren.

Die erhöhte Aktivität des Genproduktes ist erkennbar an einer entsprechend erhöhten Carotinoidproduktion verglichen mit einem Stamm, der in seiner PDR1 Expression nicht modifiziert ist.

Bevorzugt ist bei dem erfindungsgemäßen Hefestamm der Carotinoidgehalt mindestens um das 2-fache gesteigert im Vergleich zu

einem Carotinoid produzierenden Hefestamm, der das PDR1 Gen nicht überexprimiert.

Vorzugsweise ist in dem erfindungsgemäßen Hefestamm der Carotinoidbiosyntheseweg dadurch etabliert, dass die Gene *crtYB*, *crtE* und *crtI* exprimiert werden.

Besonders bevorzugt handelt es sich um das für Hefe Kodon optimierte Gen *crtE* (SEQ ID NO: 3), das für Hefe Kodon optimierte Gen *crtYB*, (SEQ ID NO: 4) und das für Hefe Kodon optimierte Gen *crtI* (SEQ ID NO: 5) aus *X. dendrorhous*.

Vorzugsweise handelt es sich bei dem erfindungsgemäßen Hefestamm um einen Stamm der Spezies *Saccharomyces cerevisiae*. Dabei handelt es sich wiederum bevorzugt um einen Stamm der Spezies *S. cerevisiae* der Enzyme, die in der Carotinoid Biosynthese beteiligt sind exprimiert und mindestens ein PDR1 Gen oder PDR1- Homolog überexprimiert.

Besonders bevorzugt handelt es sich um einen Stamm der Spezies *Saccharomyces* der die die Gene *GGPP Synthase* und *Phytoen Synthase, und/oder Phytoen Desaturase und/oder Lycopen Cyclase* exprimiert sowie mindestens ein PDR1 Gen oder PDR1-Homolog überexprimiert.

Insbesondere bevorzugt handelt es sich um den Stamm AH22th3ura8 der zusätzlich mindestens ein PDR1 Gen oder PDR1-Homolog überexprimiert.

Bei den GGPP Synthasen handelt es sich vorzugsweise um ein Enzym mit einer der folgenden Genbank ACCESSION Nr: AAT92871, XP_447025, NP_984623, XP_390273, XP_404791, XP_368486, Q92236, AAO85432, XP_572774, XP_502923, AAK11525, XP_326920, CAF32032, BAD29965, XP_384767, BAD29970, CAB89115, CAG09545, CAI13753, AAH69913, AAH67768, XP_455003, P56966, NP_001007, AAT65717, NP_956329, BAA90525, XP_405729, AAK11531, XP_412280, AAC05273, NP_523958, XP_402074, EAL30191, XP_536340, XP_424685, AAH06798, AAP06018, XP_460338, AAC05595, EAK92197, XP_535573, AAH83212,

XP_486466, CAH18006, CAA75568, XP_397455, XP_410947, XP_381914, XP_364478, XP_360889, XP_369218, XP_406544, XP_367595, XP_363775, XP_368486, XP_390273, Q92236, AAK11525, CAF32032, XP_404791, AAO85432, BAD29965, BAD29970, BAA90525, AAT65717, XP_384767, CAB89115, XP_572774, AAK11531, XP_502923, CAI13753, CAG09545, XP_412280, P56966, NP_001007, AAH69913, AAH67768, NP_956329, EAL30191, XP_424685, XP_536340, NP_523958, AAC05273, XP_405729, AAC05595, XP_402074, AAP06018, AAH06798, XP_535573, AAH83212, AAP21085, NP_984623, XP_447025, AAT92871, XP_486466, XP_410947, XP_397455, XP_455003, EAK92197, XP_381914, XP_460338, CAH18006, XP_360889, XP_406544, XP_364478, XP_363775, XP_367595, XP_369218, C39273, BAB79600, BAA14124, AAN85596, AAA32797, Q08291, S52584, S53722, AAC44848, BAA19583, S71230, BAA23157, AAC77874, CAB38744, BAA78047, BAA82613, CAB56064, BAA86284, T11021, AAF78199, AAG10424, CAC10561, T50879, BAB01343, Q42698, Q43133, P54976, BAB50600, BAB60678, BAB60820, NP_189589, NP_188651, NP_188069, NP_188073, AAL01997, AAL01998, NP_252732, NP_245470, NP_390308, NP_440010, NP_440010, AAL17614, NP_520343, AAL76349, AAM21638, AAM21639, NP_622916, AAM48650, NP_659794, AAM64496, AAM65107, NP_680811, ZP_000474, ZP_001252, NP_698760, E84566, F85434, AC1245, E83997, G84566, AH2910, D87505, A89932, F97685, AI3285, BAC42571, NP_785195, NP_790546, AAO63392, AAO93113, NP_833891, AAP59037, ZP_001374, NP_864766, NP_875521, NP_881399, NP_884694, NP_888456, NP_893187, NP_894940, NP_896835, NP_896835, AAQ65086, NP_945877, NP_946867, NP_952815, AAR37805, AAR37858, AAR98495, AAR99082, NP_965349, NP_980544, EAA96348, EAB36506, EAB36642, EAC39208, EAD26007, EAE43084, EAE70061, EAF70308, EAG88494, EAH52060, EAH78354, EAH84117, EAI11762, EAI49391, EAI54846, EAI68356, EAI68713, EAI69401, EAI73873, EAJ73634, EAJ77351, EAK70639, ZP_001751, AAS76253, ZP_001957, 1RTRB, ZP_001863, ZP_002002, ZP_001711, ZP_002073, ZP_002074, AAS82860, ZP_002108, YP_010568, BAD18313, ZP_002315, ZP_002335, AAT35222, ZP_002401, ZP_002435, ZP_002626, ZP_002702, ZP_002705, ZP_002732, ZP_002914, ZP_003024, ZP_003129, ZP_003177, ZP_003225, AAT51323, ZP_003301, YP_034222, YP_040995, YP_043579, AAT71982, AAT90315, YP_066435, YP_075673, YP_085511, YP_092166, ZP_001298, YP_105136, YP_111769,

ZP_003630, YP_129021, AAV74395, AAV74396, YP_148246, YP_156518, YP_162590, YP_171470, YP_175959, YP_186407, YP_190690, AAW66658, YP_194187, YP_197469, YP_201938, YP_196510.

Bei den Phytoen Dehydrogenasen handelt es sich vorzugsweise um Enzyme mit einer der folgenden Genbank Accession Nummern: 1613414B, 1613414F, 1904206A, 2121278A, A86203, A96612, A99470, AAA24820, AAA34001, AAA50313, AAA64981, AAA91161, AAA99519, AAC44798, AAC44850, AAC48983, AAF78201, AAG10426, AAG14399, AAG28700, AAG50743, AAH85048, AAK51545, AAK51557, AAK64299, AAL02000, AAL15300, AAL38046, AAL73986, AAL80005, AAL91366, AAM45380, AAM48646, AAM63349, AAM94364, AAN75037, AAN85599, AAO24235, AAO46892, AAO46894, AAO53257, AAO53258, AAO64750, AAO93135, AAP59036, AAP79175, AAQ04224, AAQ04225, AAQ65246, AAQ65246, AAQ88931, AAR37797, AAR37802, AAR37850, AAR37855, AAR86105, AAR98491, AAR98494, AAR98733, AAS17750, AAT01639, AAT35222, AAT74579, AAT74580, AAT76050, AAT76434, AAT90316, AAU34019, AAW23161, AB2035, AB2064, AC2446, AF1557, AF2029, AG2103, AG2509, AH1199, AI2185, AI2273, B55548, B84327, B90061, BAA14127, BAA20276, BAA76534, BAB10768, BAB50520, BAB51896, BAB68552, BAB79603, BAB82461, BAB82462, BAB98016, BAC75676, BAC77668, BAC77671, BAD07279, BAD07280, BAD07287, BAD07288, CAA52098, CAA60479, CAA66626, CAB38739, CAB38743, CAB40843, CAB56041, CAB56062, CAB59726, CAB65434, CAB94794, CAC85667, CAD19989, CAD27442, CAD55814, CAE00192, CAE83576, CAF19330, CAF21094, CAF21337, CAH91165, E90061, EAA90383, EAA98598, EAB09790, EAB14136, EAB18725, EAB29729, EAB30992, EAB41377, EAB54727, EAB76679, EAB87028, EAB92587, EAB94459, EAB96864, EAC01884, EAC38895, EAC60360, EAD05874, EAD05999, EAD20520, EAE06978, EAE70773, EAF04985, EAF51354, EAF62819, EAF75453, EAG09111, EAG19412, EAG23070, EAG25053, EAG25054, EAG29279, EAG39845, EAG56100, EAG63013, EAG68633, EAG71574, EAG89835, EAH04928, EAH04936, EAH08586, EAH22597, EAH22853, EAH31648, EAH55579, EAH68071, EAH73302, EAH79041, EAH86965, EAH97108, EAH99977, EAI01660, EAI03576, EAI06784, EAI11087, EAI15261, EAI15547, EAI17521, EAI21398, EAI29728, EAI38468, EAI43591, EAI51589, EAI58453, EAI72974, EAI77885, EAI78272, EAI80262, EAI83937, EAI86664, EAJ00517, EAJ05570, EAJ08238, EAJ15524,

EAJ18144, EAJ20649, EAJ21683, EAJ24413, EAJ28774, EAJ30522, EAJ35157, EAJ37407, EAJ39929, EAJ54356, EAJ54959, EAJ56207, EAJ58447, EAJ59958, EAJ63347, EAJ66054, EAJ67637, EAJ69812, EAJ74441, EAJ76472, EAJ76473, EAJ80355, EAJ80839, EAJ81408, EAJ86174, EAJ87600, EAJ88203, EAJ88682, EAJ92341, EAJ94774, EAJ97555, EAJ97958, EAK07654, EAK08513, EAK08529, EAK10609, EAK10614, EAK12902, EAK13034, EAK15092, EAK22483, EAK23222, EAK24187, EAK24674, EAK28785, EAK34731, EAK34742, EAK36883, EAK37522, EAK42705, EAK43213, EAK52580, EAK53452, EAK58759, EAK62665, EAK63558, F84187, F90272, G87635, G90413, H83880, H84320, JC7723, NP_060220, NP_080435, NP_193157, NP_214383, NP_276913, NP_293819, NP_294534, NP_294585, NP_295972, NP_338490, NP_376437, NP_377056, NP_388895, NP_441167, NP_441254, NP_442491, NP_442727, NP_562475, NP_568712, NP_601630, NP_601630, NP_616426, NP_624522, NP_626360, NP_630834, NP_643053, NP_647302, NP_659552, NP_661086, NP_661546, NP_661701, NP_662300, NP_681023, NP_681127, NP_682351, NP_693380, NP_693382, NP_737250, NP_763380, NP_786524, NP_822198, NP_822828, NP_827278, NP_851528, NP_857496, NP_868798, NP_869339, NP_870237, NP_874530, NP_874561, NP_874977, NP_892236, NP_892265, NP_892458, NP_893232, NP_894882, NP_895385, NP_895793, NP_895829, NP_896854, NP_896994, NP_898304, NP_898346, NP_902647, NP_923340, NP_923639, NP_923813, NP_925079, NP_931515, NP_936379, NP_940208, NP_945754, NP_946860, NP_946866, NP_948851, NP_962004, NP_968600, NP_974222, NP_974545, O49901, P17059, P54971, P54978, P54979, P54981, P54982, P74306, Q01671, Q02861, Q38893, Q40406, Q9FV46, Q9SE20, Q9SMJ3, Q9ZTN9, Q9ZTP4, S29314, S32171, S49624, S52586, S65060, T10701, T31463, T46822, T48646, T50745, T50749, T50893, T50910, T51119, T51123, XP_324732, XP_383241, XP_401825, XP_470568, XP_473486, XP_477063, XP_525801, XP_540198, YP_006049, YP_013621, YP_024310, YP_041986, YP_041988, YP_044561, YP_044564, YP_062471, YP_117947, YP_120612, YP_135077, YP_136483, YP_145331, YP_145348, YP_171014, YP_172823, YP_173078, YP_173207, YP_184572, YP_187368, YP_187371, YP_187371, YP_187371, ZP_000490, ZP_000509, ZP_000518, ZP_000566, ZP_000627, ZP_000627, ZP_001073, ZP_001081, ZP_001091,

ZP_001116, ZP_001117, ZP_001119, ZP_001124, ZP_001510, ZP_001591, ZP_001593, ZP_001602, ZP_001614, ZP_001645, ZP_001650, ZP_001722, ZP_001746, ZP_001752, ZP_001770, ZP_001777, ZP_001787, ZP_001837, ZP_001867, ZP_002073, ZP_002077, ZP_002339, ZP_002680, ZP_002705, ZP_002771, ZP_002892, ZP_002916, ZP_002963, ZP_003022, ZP_003036, ZP_003107, ZP_003202, ZP_003258, ZP_003268, ZP_003269, ZP_003276, ZP_003283, ZP_003557, ZP_003559, ZP_003565, ZP_003577, ZP_003593, ZP_003595, ZP_003685.

Bei den Synthasen and Lycopin Cyclasen_handelt es sich vorzugsweise um Enzyme mit einer der folgenden Genbank Accession Nummern: 1613414C, A49558, AAA19428, AAA32836, AAA64982, AAB87738, AAC44849, AAD38051, AAF78202, AAF82616, AAG10427, AAG28701, AAK07734, AAK07735, AAK15621, AAL02001, AAL76346, AAL82578, AAM45379, AAM48647, AAM62787, AAM94363, AAN85600, AAO24767, AAO39835, AAO46895, AAO47570, AAO73816, AAP22038, AAP55451, AAP55453, AAP55461, AAP55471, AAP55484, AAP55486, AAP56083, AAP56124, AAP56127, AAP56136, AAP56148, AAP56155, AAP56156, AAP56157, AAP56158, AAP79176, AAQ91837, AAR08445, AAR31885, AAR37803, AAR37856, AAR86104, AAR87868, AAR98492, AAS02284, AAS17009, AAS18307, AAT28184, AAT35222, AAT38473, AAT46069, AAT74581, AAT90319, AAV74394, AAW23162, AC2035, AC2035, BAB18514, BAB79604, BAD07278, BAD07286, BAD62106, BAD62107, C90061, CAA47625, CAA68575, CAB07958, CAB38740, CAB51949, CAB56063, CAB86388, CAB93661, CAB94795, CAC19567, CAC27383, CAD19988, CAD29284, CAE76609, E37802, E84320, EAA98758, EAB01965, EAB04170, EAB07138, EAB09791, EAB19826, EAB35029, EAB41375, EAB78706, EAB92586, EAC06949, EAC18360, EAC25793, EAC29883, EAC32813, EAC33105, EAC38486, EAC52233, EAC60029, EAC68026, EAC96197, EAD08701, EAD20866, EAD32755, EAD38008, EAD50152, EAD50402, EAD81123 EAD93882, EAE12860, EAE16121, EAE31084, EAE35665, EAE44717, EAE46627, EAE47846, EAE72264, EAE76009, EAE86335, EAE89581, EAF18881, EAF64277, EAF67931, EAF84745, EAF94004, EAG06083, EAG21950, EAG43625, EAG50171, EAG57517, EAG62787, EAG65580, EAG68110, EAG72283, EAG78750, EAG80445, EAG93220, EAH04927, EAH08972, EAH10377, EAH22151, EAH31461, EAH50033, EAH64480, EAH79040, EAH99976, EAI02786,

EAI02787, EAI03575, EAI05900, EAI61004, EAI70669, EAI83938, EAJ05110, EAJ05569, EAJ08876, EAJ35156, EAJ38900, EAJ49645, EAJ54357, EAJ60475, EAJ64125, EAJ67499, EAJ76471, EAJ76950, EAJ78637, EAJ78787, EAJ79616, EAJ80356, EAJ81914, EAJ87417, EAK08514, EAK08523, EAK12901, EAK22180, EAK24859, EAK28345, EAK34732, EAK34736, EAK37296, EAK37521, EAK56335, G84363, NP_274195, NP_284085, NP_294586, NP_388961, NP_441168, NP_443763, NP_624523, NP_630832, NP_662273, NP_682350, NP_693381, NP_786525, NP_822199, NP_822829, NP_851527, NP_868799, NP_874560, NP_879992, NP_884101, NP_889809, NP_892264, NP_895828, NP_898345, NP_902648, NP_902649, NP_924690, NP_931516, NP_946861, NP_949079, NP_962005, NP_968601, O07333, P08196, P21683, P37269, P37271, P37272, P53797, P54975, P54977, P65860, Q9SSU8, Q9UUQ6, S22474, S32170, S52587, S56668, S68307, T10702, T46594, T50746, T50895, XP_324765, XP_383242, XP_403902, YP_006040, YP_103126, YP_112342, YP_117945, YP_120611, YP_136628, YP_136629, YP_145340, YP_145343, YP_160917, YP_160918, YP_162605, YP_172822, YP_187369, YP_192648, ZP_000044, ZP_001091, ZP_001591, ZP_001657, ZP_001690, ZP_001746, ZP_001837, ZP_001867, ZP_002096, ZP_002248, ZP_002450, ZP_002680, ZP_002710, ZP_002791, ZP_002892, ZP_002916, ZP_003036, ZP_003269, ZP_003351, ZP_003487, ZP_003501, ZP_003591, ZP_003628.

Bei den Carotinoid Ketolasen handelt es sich vorzugsweise um Enzyme mit einer der folgenden Genbank Accession Nummern: AAA99932, AAB48668, AAC25611, AAF78203, AAH16427, AAN03484, AAN85497, AAN86030, AAO64399, AAQ23139, AAT35222, AAT35555, AAV41372, AB2307, AF2204, BAB54999, BAB58879, BAC98366, CAA60478, CAB56059, D87673, EAA79304, EAA80363, EAA81403, EAA84711, EAB82380, EAB86624, EAC05755, EAD12219, EAD71182, EAD94927, EAF11582, EAF98072, EAG19345, EAG38273, EAG79800, EAG96474, EAH00349, EAH36448, EAH40683, EAH53180, EAH96648, EAI05260, EAI17468, EAI53009, EAI54054, EAI67818, EAI68153, EAI89684, EAJ27674, EAJ45589, EAJ45589, EAJ67118, EAJ74221, EAJ74653, EAJ88396, EAJ88887, EAK06069, EAK11467, EAK16824, EAK28828, EAK28828, EAK31112, EAK42591, NP_045063, NP_081575,

NP_338204, NP_440788, NP_441220, NP_682690, NP_770721, NP_848964, NP_857223, NP_881760, NP_882469, NP_886657, NP_895643, NP_896386, NP_897461, NP_924674, NP_927525, NP_947075, P54972, Q39982, Q44261, T31123, XP_330780, XP_368852, XP_380194, XP_383758, XP_405100, XP_409222, YP_102417, YP_108945, YP_132414, YP_154670, YP_166682, YP_168846, YP_172377, ZP_001068, ZP_001112, ZP_001607, ZP_001757, ZP_001787, ZP_002218, ZP_002456, ZP_003028, ZP_003107, ZP_003264, ZP_003458, ZP_003513.

Bei den Carotinoid Hydroxylasen handelt es sich vorzugsweise um Enzyme mit einer der folgenden Genbank Accession Nummern: AAC44852, AAC49443, AAD54243, AAG10430, AAG10793, AAG33636, AAL80006, AAM44971, AAM51300, AAM77007, AAN85601, AAO53295, AAS48097, AAS55552, AAS88426, AAT48741, AAT84408, AAV85452, AAV85453, BAA14129, BAB79605, BAC77670, BAD07283, BAD07291, CAA70427, CAA70888, CAB55625, CAB55626, CAB56060, CAC06712, CAC95130, EAB30128, EAC49462, EAC86129, EAD61089, EAD76156, EAD88640, EAE27903, EAE28203, EAE78743, EAF12173, EAH29370, EAH44202, EAI00766, EAI29017, EAJ30844, EAJ72524, EAK10611, EAK53455, EAK63955, H90469, NP_745389, NP_922503, P54973, Q44262, S52982, XP_473611, YP_024309, ZP_003055, ZP_003107.

Bei den Astaxanthin Synthasen und putativen Astaxanthin Synthasen handelt es sich vorzugsweise um Enzyme mit einer der folgenden Genbank Accession Nummern: AAM56288, XP_571276, EAL20013, XP_401804, XP_397817, XP_399595, XP_403279, XP_382294, XP_406021, XP_381224, XP_391479, XP_569261, EAL22841, XP_359866.

Bei den Lycopene Cyclasen, beta and epsilon Untereinheiten handelt es sich vorzugsweise um Enzyme mit einer der folgenden Genbank Accession Nummern: AAK07431, ABB52073, Q38932, AAB53336, AAG10428, AAK07434, AAM45382, O65837, AAL69394, BAE79549, XP_463351, AAS48096, AAX92679, AAL92114, AAK07433, AAL47019, AAT46065, BAD07293, BAD07285, BAD07277, EAJ62839, BAE43547, BAE43550, BAE43557, BAE43558, BAE43553, BAE43545, BAE43556, BAE43552, BAE43560, BAE43554, BAE43551, BAE43519,

BAE43535, BAE43541, BAE43542, BAE43517, BAE43534, BAE43537, BAE43533, BAD02774, BAD02766, BAE43540, BAE43514, BAE43544, BAE43538, BAE43528, BAE43546, BAE43526, BAE43543, BAD02742, BAD02770, BAE43522, BAE43559, BAE43527, BAE43548, AAF44700, BAE43555, BAE43549, AAU14144, AAN86060, AAR89632, AAM21152, AAD38049, AAU05146, AAU05145, AAK07430, ABB72443, BAE79544, BAE78471, Q43415, AAF23013, ABB52071, AAW88382, AAG10429, AAM45381, AAM14335, AAO18661, AAA81880, Q43503, S66350, XP_464409, CAD70565, Q43578, AAL92175, AAX54906, S66349, AAG21133, CAB92977, CAB93342, Q9SEA0, Q42435, AAO64977, Q40424, ABB52072, AAQ02668, CAA54961, EAJ62838, YP_401079, YP_172741, ZP_011 , EAK50052, NP_892751, NP_875182, YP_382237, YP_397130, NP_896821, YP_397570, ZP_010 , EAK17149, YP_291882, NP_875528, NP_893181, NP_895600, EAI47456, YP_291268, ZP_010 , AAF34191, ZP_010 , YP_376736, ZP_003 , NP_894954, AAT76051, EAK22047, NP_294525.

Saccharomyces Stämme, insbesondere auch *S. cerevisiae* Stämme sind erhältlich beim Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig.

Besonders bevorzugt umfasst der erfindungsgemäße Stamm zusätzlich eine transkriptionell deregulierte HMG-CoA Reduktase. Die HMG-CoA Reduktase ist dabei vorzugsweise derart dereguliert, dass das gebildete Enzym keine N-terminale Membrandomäne mehr besitzt, sondern nur noch die katalytische Untereinheit. Dadurch erfolgt keine Feedback-Regulation mehr durch Intermediate des Isoprenoid-Stoffwechsels.

Insbesondere bevorzugt handelt es sich bei dem erfindungsgemäßen Stamm um AH22tH3ura8-GK4-GK6.

Ein erfindungsgemäßer Hefestamm wird beispielsweise hergestellt, indem in *Saccharomyces*, vorzugsweise in *S. cerevisiae* die genannten Gene, vorzugsweise die heterologen Gene *GGPP Synthase* und *Phytoen Synthase, und/oder Phytoen Desaturase und/oder Lycopen Cyclase* eingebracht und exprimiert sowie das

Gen *PDR1* überexprimiert oder ein PDR1-Homolog eingebracht und überexprimiert wird. Bevorzugt werden für Hefe Kodon optimierte Varianten der Gene verwendet, wie sie beispielsweise vorstehend genannt wurden. Die Expression bzw. Überexpression der genannten Gene kann sowohl episomal als auch chromosomal erfolgen.

Die Transformation der Hefezellen mit den genannten Genen erfolgt vorzugsweise in fachüblicher Weise, wie beispielsweise in Schiestl R.H., et al., Curr Genet. Dec, 16(5-6): 339-346 (1989), oder Manivasakam P., et al., Nucleic Acids Res. Sep 11, 21(18): 4414-4415 (1993), oder Morgan R.J., Experientia Suppl., 46: 155-166 (1983) beschrieben.

Für die Expression der heterologen Gene bzw. die Überexpression nativer Gene werden vorzugsweise Promotoren verwendet, welche keiner Katabolit-Repression unterliegen und keine spezielle Kohlenstoffquelle für eine Induktion benötigen. Dem Fachmann sind solche Promotoren bekannt. Dazu zählen beispielsweise Promotoren der Gene Phosphofructokinase (PPK, Triose Phosphat Isomerase (TPI), Glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase (GPD,TDH3 oder GAPDH), Pyruvat Kinase (PYK), Phosphoglycerat Kinase (PGK), Glucose-6-phosphate Isomerase promoter (PGI1). Weitere geeignete Promotoren können der Anmeldung WO 93/03159 entnommen werden. Geeignete Promotoren sind ferner ribosomale Proteine kodierende Gene Promotoren (TEFI), der Laktase Gen Promotor (LAC4), der Alkohol Dehydrogenase Promotor (ADH1), vorzugsweise eine veränderte (konstitutive) Version des ADH1 Promotors (SEQ ID NO: 8), ADH4 und ähnliche), der Enolase Promotor (ENO1) und der Hexose(Glukose) Transporter Promotor (HXT7). Aber auch andere Promotoren, sowohl konstitutiv als auch induzierbar und Enhancer oder Upstream aktivierende Sequenzen sind dem Fachmann bekannt.

Geeignete Terminator Sequenzen sind z.B. erhältlich aus dem Cytochrom c1 (CYC1) Gen oder dem Enolase 1 (ENO1) Gen.

Bevorzugte Promotoren sind der TEF1 Promotor, TDH3 Promotor, konstitutive Version des ADH1 Promotors, ENO1 Promotor

Vorzugsweise werden die heterologen Gene, besonders bevorzugt die Gene *GGPP Synthase* und *Phytoen Synthase, und/oder Phytoen Desaturase und/oder Lycopen Cyclase* durch chromosomale Integration beispielsweise in Form einer Genkassette in *S. cerevisiae* eingebracht. Das Gen PDR1 bzw ein PDR1 Homolog wird vorzugsweise ebenfalls in Form einer Genkassette eingebracht. Ein derartiges Verfahren ist in den Beispielen beschrieben.

Die Sequenz der Gene *Phytoen Synthase/Lycopene Cyclase, GGPP Synthase* und *Phytoen Desaturase* ist bekannt aus den Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI).

PDR1 kodiert für einen Transkriptionsfaktor der Hefe. Seine Gensequenz ist bekannt aus den Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Bevorzugt kann der erfindungsgemäße Hefestamm dadurch hergestellt werden, dass in einen *S. cerevisiae* Stamm, der Carotinoide herstellen kann, da er die heterologen Gene kodierend für die Enzyme *Phytoen Synthase/Lycopene Cyclase, GGPP Synthase* und *Phytoen Desaturase* von *X. dendrorhous* enthält, und bei dem das HMG-CoA Reductase Gen dereguliert ist, das PDR1 Gen oder ein Homolog des PDR1 Gens eingebracht und überexprimiert wird.

Vorzugsweise lässt sich ein erfindungsgemäßer Hefestamm herstellen, indem ein Hefestamm mit einem deregulierten Terpenbiosyntheseweg als Ausgangsstamm verwendet wird. Die Herstellung derartiger Stämme ist beispielsweise in WO2011023298 beschrieben.

Derartige Stämme weisen eine starke Überproduktion des Triterpens Squalen und sämtlicher Vorstufen, welche für die Carotinoidproduktion relevant sind auf (siehe Figur 1). Unter einer starken Überproduktion ist dabei vorzugsweise zu verstehen, dass nach 72 h Kultivierung unter Standardbedingungen im Schüttelkolben >10% der Biotrockenmasse Squalen oder eine der genannten Vorstufen ist. Vorzugsweise lässt sich mit einem erfin-

dungsgemäßen Stamm ein Carotinoid ausgewählt aus der Gruppe Phytoen, beta-Carotin, beta-Cryptoxanthin, Zeaxanthin produzieren.

Die Deregulation des Terpenbiosyntheseweges wird vorzugsweise dadurch erreicht, dass die HMG-CoA-Reduktase transkriptionell dereguliert sowie der negativen Regulation auf Proteinebene entzogen wurde. Die HMG-CoA-Reduktase ist das Schlüsselenzym für die Terpen-Überproduktion, da es als Schrittmacherenzym im Sterol-Biosyntheseweg bekannt ist und einen "Flaschenhals" im Biosyntheseweg von Acetyl-CoA bis Squalen darstellt (siehe Figur 1). In diese Stämme wird ein PDR1 Gen in an sich bekannter Art und Weise eingebracht. Der Stamm muss mind. die beiden Enzyme GGPP-Synthase und Phytoen Synthase exprimieren und kann ggf. beliebig viele weitere Carotinoidsynthesegene exprimieren.

Diese Hefestämme werden in an sich bekannter Art und Weise kultiviert und das Carotin nach Zellaufschluss isoliert. Die Produktion von Carotinoiden mit Hefen der Gattung *Saccharomyces*, ist beispielsweise in Ukibe, K., Hashida, K., Yoshida, N., Takagi, H., Applied and Environmental Microbiology. 2009, 75 (22), pp. 7205 - 7211; Verwaal, R., Jiang, Y., Wang, J., Yeast. 2010, 27 (12), pp. 983-998; Verwaal, R., Wang, J., Meijnen, J.-P., Applied and Environmental Microbiology. 2007, 73 (13), pp. 4342 - 4350; Misawa, N., Shimada, H., Journal of Biotechnology. 1997, 59 (3), pp. 169-181 oder Schmidt-Dannert, C., Curr Opin Biotechnol. 2000, 11 (39), pp. 255-61 beschrieben. Die Erfindung betrifft somit auch ein Verfahren zur Herstellung von Carotinoiden bei dem ein Hefestamm in an sich bekannter Art und Weise fermentiert wird und die Carotinoide nach Zellaufschluss isoliert dadurch gekennzeichnet, dass der Hefestamm ein erfindungsgemäßer Hefestamm ist.

Überraschenderweise findet sich nach 120 bis 144 h Kultivierung des Stammes im Schüttelkolben eine signifikant erhöhte Menge an intrazellulärem Carotinoiden. Der Gehalt an intrazellulären Ca-

rotinoiden wurde nach einem Zellaufschluss per HPLC bestimmt und mit dem Wert eines Kontrollstammes verglichen, welcher nur die Carotinoidsynthesegene exprimiert und nicht das *PDR1* Gen überexprimiert.

Figur 1 zeigt exemplarisch den Biosyntheseweg von Squalen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*.

Figur 2 zeigt die Genkasette 4, die in Beispiel 3 hergestellt und verwendet wird.

Figur 3 zeigt zeigt die Genkasette 6, die in Beispiel 4 hergestellt und verwendet wird.

Figur 4 zeigt exemplarisch den Carotinoid-Biosyntheseweg in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Die folgenden Beispiele dienen der weiteren Erläuterung der Erfindung.

Beispiel 1: Kultivierung für die Stammevaluierung (Wachstum und Produktivität)

Die Standard Kultivierung für die Stämme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* war folgende:

1) Vorkultur: 20 ml WMVIII Medium wurde in einem 100 ml Schüttelkolben mit 20 µl der entsprechenden Glycerinkultur angeimpft und für 48 h bei 30 °C und 150 rpm auf einem Inkubationsschüttler geschüttelt.

2) Hauptkultur: 20 ml WMVIII Medium wurde in einem 100 ml Schüttelkolben mit 1 % (v/v) der Vorkultur angeimpft und für 120 h bei 30 °C und 150 rpm auf einem Inkubationsschüttler geschüttelt.

Stämme mit genetischem Hintergrund von AH22tH3ura8-GK4 (Herstellung siehe Beispiel 2 und 3) sind auxotroph für Leucin. Daher wurde das Medium mit Leucin supplementiert (400 mg/L)

Stämme mit genetischem Hintergrund von AH22ura3 oder AH22tH3ura8 sind auxotroph für Leucin und Uracil. Daher wurde das Medium mit Leucin (400 mg/L) und Uracil (100 mg/L) supplementiert).

Zusammensetzung des WMVIII Mediums (1 L): 50 g Saccharose, 250 mg $NH_4H_2PO_4$, 2,8 g NH_4Cl, 250 mg $MgCl_2$ x $6H_2O$, 100 mg $CaCl_2$ x $2H_2O$, 2 g KH_2PO_4, 550 mg $MgSO_4$ x $7H_2O$, 75 mg meso-Inositol und 10 g Na-glutamat.
Die beschriebenen Substanzen wurden abgewogen und mit 1 L destilliertem Wasser aufgefüllt. Nach dem Autoklavieren wurden sterilfiltrierte (0,22 µm) Spurenelemente, Vitamine und Aminosäuren zugesetzt: 1 ml 1000 x Spurenelemente, 4 ml 250 x Vitamin Lösung (Stocklösungen).

Spurenelemente: 1000 fach konzentriert, für einen Liter: 1,75 g $ZnSO_4$ x $7H_2O$; 0,5 g Fe_2SO_4 x 7 H_2O; 0,1 g $CuSO_4$ x 5 H_2O; 0,1 g $MnCl_2$ x 4 H_2O; 0,1 g $NaMoO_4$ x 2 H_2O.

Vitamin Lösung: 250 fach konzentriert, für einen Liter: 2,5 g Nikotinsäure; 6,25 g Pyridoxin; 2,5 g Thiamin; 0,625 g Biotin; 12,5 g Ca-Pantothensäure.

Beide Lösungen wurden sterilfiltriert (0,22 µm). Leucin wurde supplementiert, falls erforderlich (400 mg/l).
Aminosäure Stocklösungen wurden in einer Konzentration von 20 mg/ml hergestellt und sterilfiltriert.

Beispiel 2: Konstruktion des Stammes AH22tH3ura8

Die DNA Sequenz von t-HMG1 (Basson et al. (Mol. Cell. Biol. 8 (1988), 3793-3808)wurde mit PCR aus genomischer DNA von *Saccharomyces cerevisiae* S288C erhältlich bei der American Type Culture Collection (ATCC 204508) unter Verwendung von Standardmethoden amplifiziert (Mortimer and Johnston (Genetics 113 (1986), 35-43).

Die Primer, die in diesem Falle verwendet wurden waren das DNA Oligomer tHMG-5' (SEQ ID NO: 1) und tHMG-3' (SEQ ID NO: 2). Das DNA Fragment, das erhalten wurde, wurde nach Klenow Behandlung in den Klonierungsvektor pUC19, erhältlich bei New England Biolabs Inc., USA, Ipswich eingebracht und führte zum Vektor pUC19-tHMG.

Nach Plasmidisolierung und Restriktion von pUC19-tHMG mit den Endonukleasen EcoRI und BamHI wurde das erhaltene Fragment in den Hefe Expressionsvektor pPT2b (Lang and Looman (Appl. Microbiol. Biotechnol. 44 (1995), 147-156) eingebracht, der auch mit EcoRI und BamHI behandelt wurde. Das Plasmid pPT2b-tHMG das so hergestellt wurde, beinhaltet den verkürzten ADH1-Promotor (Bennetzen and Hall (Yeast 7 (1982), 475-477) und TRP1-Terminator (Tschumper G, Carbon J. Sequence of a yeast DNA fragment containing a chromosomal replicator and the TRP1 gene. Gene. 1980 Jul; 10(2):157-166) zwischen denen das tHMG1-DNA Fragment gefunden werden kann.

Ein DNA Bereich wurde aus dem Vektor pPT2b-tHMG mit den Endonukleasen EcoRV und NruI isoliert. Dieser Bereich trägt den sogenannten mittellangen ADH1-Promotor, das t-HMG1 Gen und den TRP1- Terminator.

Dieses DNA Stück wurde in den Hefe Vektor YEp13 erhältlich bei der American Type Culture Collection (ATCC 37115) eingebracht (Fischhoff et al. (Gene 27 (1984), 239-251)), der mit der Endonukleasen SphI und einer DNA Polymerase behandelt worden war. Das resultierende Plasmid YEp13-tHMG wurde in *S. cerevisiae* AH22URA3 (Polakowski et al 1999; *AH22 ist kommerziell erhältlich; Herstellung von AH22ura3 ist beschrieben*)eingebracht.

Chromosomale Integration von t-HMG1 in AH22ura3 unter Verwendung des chromosomalen integrativen Plasmids YDpUHK3

Der Vektor YEpH2 (US2004235088 A1) wurde behandelt mit den Endonucleasen EcoRV and NruI. Dadurch wurde ein DNA Fragment mit folgenden Bereichen produziert: eine transkriptions-

aktivierende Region des Tetracyclin Resistenz Gens (Sidhu and Bollon (10 (1990) 157-166)), der mittellange ADH1-Promotor, der t-HMG1 und TRP1 Terminator (Expressionskassette).
Dieses DNA Fragment wurde eingebracht in den Vektor YDpU (Berben et al. 1991 Berben G., Dumont J., Gilliquet V, Bolle P-A. und Hilger F. (1991), Yeast 7, 475-477) der mit StuI behandelt wurde. Der Vektor YDpUH2/12, der damit produziert wurde, wurde mit den Endonukleasen SmaI behandelt und mit einer DNA Sequenz ligiert, die für Kanamycin Resistent codiert (Webster, T. D., Dickson, R. C. (1983), Gene 26: 243-252).
Das Konstrukt, das damit hergestellt wurde (YDpUHK3) wurde mit EcoRV behandelt. Der Hefe Stamm *Saccharomyces cerevisiae* AH22 (ATCC 38626; ATCC Manassas, Virginia) wurde mit diesem Konstrukt transformiert.

Die Transformation der Hefe mit dem linearisierten Vektor resultiert in der chromosomalen Integration des gesamten Vektors im URA3 Genlokus. Um die Bereiche des integrierten Vektors zu eliminieren, die nicht Bestandteil der Expressionskassette sind (E. coli origin, E. coli-ampicillin Resistenz Gen, TEF-promotor und Kanamycin Resistenz Gene), wurden die transformierten Hefen einem Selektionsdruck durch FOA Selektion unterzogen (Boeke et al. (Methods in Enzymology 154 (1987), 164-175)), das die Uracil-Auxotrophie in Hefe begünstigt.

Der so erhaltene Uracil-auxotrophe Stamm trägt den Namen AH22tH3ura8 (Polakowski 1998) und hat die t-HMG1 Expressionskassette chromosomal im URA3 Gen integriert.

Beispiel 3:
Konstruktion des Stamme AH22tH3ura8-GK4

Die Gene *crtE* (für Hefe Kodon optimiert, SEQ ID NO: 3), *crtYB* (für Hefe Kodon optimiert, SEQ ID NO: 4) und *crtI* (für Hefe Kodon optimiert SEQ ID NO: 5) von *X. dendrorhous* wurden bei GeneArt (GenArt Regensburg) in einem Cluster (Genkassette 4, GK4) synthetisiert.

Die drei Gene wurden angeordnet wie in Figur 2 mit dem URA3 Marker Gen für Selektion in Hefe (URA3 kodierende Region inkl. 400 bp upstream und 200 bg downstream; Sequenz siehe http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/getSeq?query=YEL021W&flankl=400&flankr=200&format=fasta) und flankierenden Regionen, die homolog zu dem nativen HO Lokus sind (die ersten und letzten 40 bp der HO kodierenden Region. Sequenz siehe http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/getSeq?query=YDL227C&seqtype=ORF%20Genomic%20DNA&format=fasta) für die genomische Integration der Genkassette in den HO Lokus.

Für die Expression der *crtE* Gene wird eine modifizierte (konstitutive) Version des ADH1 Promotors (SEQ ID NO: 8) und TRP1 Terminators verwendet (300 bp downstream von der TRP1 kodierenden Region; Sequenz siehe http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/getSeq?query=YDR007W&flankl=1000&flankr=1000&format=fasta), während für das *crtYB* Gen der ENO1 Promotor und ENO1 Terminator verwendet werden (600 bp upstream und 300 bp downstream der ENO1 kodierenden Region; Sequenz siehe http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/getSeq?query=YGR254W&flankl=600&flankr=300&format=fasta) und für das *crtI* Gen der TDH3 Promotor und TDH3 Terminator verwendet werden (600 bp upstream und 300 bp downstream der TDH3 kodierenden Region, Sequenz siehe http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/getSeq?query=YGR192C&flankl=600&flankr=300&format=fasta).

Der Stamm AH22tH3ura8 aus Beispiel 2 wird für die Transformation mit dieser Genkassette verwendet (Figur 2). Nach Transformation des entsprechenden Hefe Stammes mit der Genkassette via der Lithium Acetat Methode (Gietz et al., 1992) wurde er auf WMVIII(Lang and Looman, 1995) Agar Platten ohne Uracil für die Selektion auf Uracil prototrophe Kolonien kultiviert (Transformanten, die die Expressionskassette anstatt der HO kodierenden Region im Genom tragen). Es wurde der Stamm AH22tH3ura8-GK4 erhalten.

Beispiel 4: Überexpression des *S. cerevisiae* PDR1 Gens

Das Gen PDR1 (für Hefe Kodon optimiert, SEQ ID NO: 6) wurde bei GeneArt (GeneArt, Regensburg, Deutschland) in einem Cluster (Genkassette 6, GK6) mit dem LEU2 Marker für die Selektion von positiven Transformanten (die LEU2 kodierende Region inkl. 400 bp upstream und 200 bp downstream; Sequenz siehe http://www.yeastgenome.org/cgibin/getSeq?query=YCL018W&flankl=400&flankr=200&format=fasta) und mit flankierenden Regionen, die homolog zu dem nativen YHRCΔ14 Lokus sind (die ersten und letzten 40 bp der YHRCΔ14 kodierenden Region, Sequenz siehe http://www.yeastgenome.org/cgibin/getSeq?query=YHRCdelta14&seqtype=ORF%20Genomic%20DNA&format=fasta)synthetisiert.
Für die Expression des PDR1 Gens wurde der ENO1 Promotor und ENO1 Terminator verwendet(600 bp upstream and 300 bp downstream der ENO1 kodierenden Region; Sequenz siehe http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/getSeq?query=YGR254W&flankl=600&flankr=300&format=fasta)

Der Stamm AH22tH3ura8-GK4 aus Beispiel 3 (der *crtE*, *crtYB* and *crtI* exprimiert) wurde mit dieser Genkassette transformiert. Die Transformation erfolgte mit der Lithium Acetat Methode (Gietz et al., 1992). Der Stamm wurde auf WMVIII(Lang and Looman, 1995) Agar Platten ohne Uracil und Leucin für die Selektion auf Uracil und Leucin prototrophe Kolonien kultiviert.

Die Biotrockensubstanz (BTS) sowie die Konzentration der produzierten Carotinoide wurde für den so hergestellten erfindungsgemäßen Stamm AH22tH3ura8-GK4-GK6 sowie für den aus dem Stand der Technik bekannten Ausgangsstamm AH22tH3ura8-GK4 gemäß Stand der Technik bestimmt, nachdem die Stämme jeweils für 120 h in Schüttelkolben in WMVIII Medium bei 28 °C auf einem Inkubationsschüttler kultiviert wurden.

Für die Extraktion der Carotinoide wurden 1,8 ml Kultur in ein Eppendorf Gefäß gegeben. Die Zellen wurden pelletiert und zweimal mit 1 ml H_2O gewaschen. Nach dem zweiten Waschen wurden die resuspendierten Zellen in ein vorher abgewogenes Gefäß gegeben,

in das ein Loch in den Deckel gestoßen war. Die Zellen wurden über Nacht lyophilisiert. Nach vollständigem Trocknen wurde das Gefäß erneut gewogen, um die Zelltrockenmasse zu errechnen. 0,25 ml der gleichen Kultur wurden in ein 2 ml Gefäß gegeben zur Carotinoid Extraktion. Die Zellen wurden pelletiert und der Überstand wurde abgenommen. Die pelletierten Zellen wurden bei -80 °C eingefroren und gelagert.

Das gleiche Volumen an kubischen Zirkonia Beads wurde zu den Zellpellets gegeben, zusammen mit 1 ml eiskalter Extraktionslösung (eine 50/50 v/v Mischung von Hexan und Ethylacetat, die 0.01% Butylhydroxytoluol (BHT) enthält). Die Mischung wurde geschüttelt (Mini-BeadBeater-8, BioSpec Products, Inc.) auf höchster Stufe für 5 Minuten bei 4 °C. Die Mischung wurde anschließend für eine Minute zentrifugiert (max. Geschwindigkeit) und der Überstand wurde gesammelt und in ein gekühltes 16 ml Glass Fläschchen gegeben.
Die Zellüberbleibsel wurden nochmals mindestens dreimal extrahiert ohne die Zugabe von Zirkonia Beads. Alle Überstände wurden in einem 16 ml Glas Fläschchen gepoolt. Nach der Extraktion wurden die Glas Fläschchen bei 4 °C für 5 Minuten bei 2000 rpm in einer Sorvall Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand in ein neues 16 ml Glas Fläschchen transferiert. Mit einer Speed Vac wurden die Überstände konzentriert (Raumtemperatur im Dunkeln) und die Proben wurden bei -20 °C oder -80 °C gelagert bis kurz vor der HPLC Analyse. Während der gesamten Durchführung wurde darauf Acht gegeben, dass Kontakt mit Sauerstoff, Licht, Hitze und Säure vermieden wird.

Für die Carotinoid Analyse wurden die Proben resuspendiert in eiskaltem Extraktionslösemittel. Eine Alliance-HPLC 2795 (Waters), die mit einer Waters XBridge C18 Säule (3,5 µm, 2,1x50 mm) ausgestattet war und einer Thermo Basic 8 Vorsäule (2,1 x 10 mm), wurde verwendet.
Verlässliche Carotinoid Proben wurden als Standards verwendet. Die mobilen Phasen und Fließgeschwindigkeiten sind unten gezeigt (Lösemittel A=Ethyl Acetate; Lösemittel B=Water; Lösemittel C=Methanol; Lösemittel D=Acetonitrile).

Das Injektionsvolumen war 10 µl. Der Detektor war ein Waters 996 Photodioden Array Detektor. Die Retentionszeiten für lipophile Moleküle sind: Astaxanthin (1.159 min), Zeaxanthin (1.335), β-Apo-8'-carotenal (2.86 min), Ergosterol (3.11 min), Lycopin (3.69 min), β-Carotin (4.02 min) und Phytoen (4.13 min). Astaxanthin, Zeaxanthin, β-Apo-8'-carotenal, Lycopin and β-Carotin wurden bei 475 nm detektiert, Phytoen bei 286 nm.

Tabelle 1: Retentionszeiten für Lipophile Moleküle

Zeit (min)	Flussrate (mL/min)	% A	% B	% C	% D
	0.50	0.0	20.0	0.0	80.0
3.00	1.00	20.0	0.0	0.0	80.0
4.50	1.00	80.0	0.0	20.0	0.0
5.50	1.00	0.0	0.0	60.0	40.0
6.50	1.00	0.0	0.0	80.0	20.0
7.50	1.00	0.0	0.0	100.0	0.0
8.50	1.00	0.0	0.0	100.0	0.0
9.50	1.00	0.0	20.0	0.0	80.0
10.50	0.50	0.0	20.0	0.0	80.0

The Ergebnisse sind in Tab. 2 wiedergegeben.

Tabelle 2: Carotinoid-Produktion des *S. cerevisiae* Stammes AH22tH3ura8-GK4 mit und ohne zusätzliche Expression des PDR1 Gens (auf GK6).

Stamm	Kultivierungs-dauer [h]	BTS [g/l]	Phytoen [µg/g_{BTS}]	Beta-Carotin [µg/g_{BTS}]
AH22tH3ura8-GK4-GK6	120	10.5	11017	842
AH22tH3ura8-GK4	120	10.8	2661	294

BTS: Biotrockensubstanz

Es zeigte sich, dass der erfindungsgemäße Stamm, welcher das PDR1 Gen trägt (Zeile 1 von Tab. 2), deutlich höhere Mengen an Carotinoiden produziert als der Stamm gemäß Stand der Technik.

Patentansprüche

1. Hefestamm der Gattung *Saccharomyces* mit etabliertem Carotinoidbiosyntheseweg, dadurch gekennzeichnet, dass er ein PDR1 Gen oder PDR1-Homolog überexprimieren kann.

2. Hefestamm gemäß Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem *PDR1* bzw. dem PDR1 Homologen, um das für Hefe Kodon optimierte Gen PDR1 mit SEQ ID NO: 6 handelt.

3. Hefestamm gemäß Anspruch 1 oder 2 dadurch gekennzeichnet, dass es sich um einen Stamm der Spezies *Saccharomyces cerevisiae* handelt.

4. Hefestamm gemäß Anspruch 1, 2 oder 3 dadurch gekennzeichnet, dass er die Gene *GGPP Synthase* und *Phytoen Synthase, und/oder Phytoen Desaturase und/oder Lycopen Cyclase* exprimiert sowie mindestens ein PDR1 Gen oder PDR1-Homolog überexprimiert.

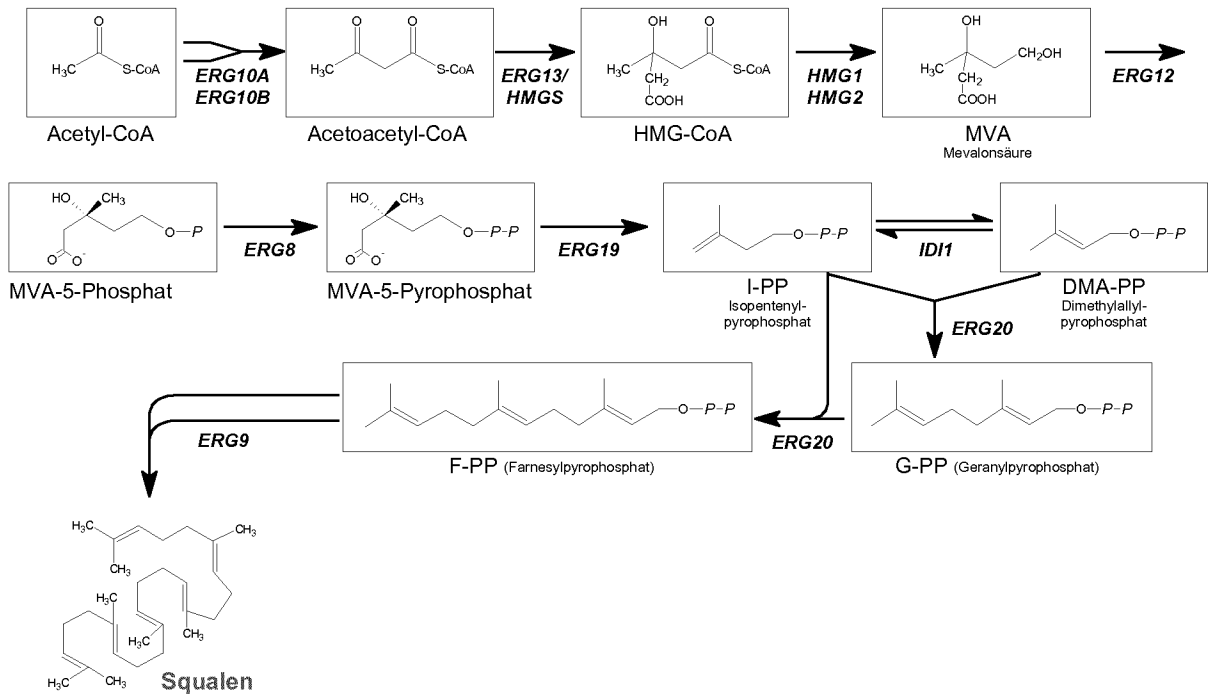
5. Hefestamm gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 dadurch gekennzeichnet, dass er eine transkriptionell deregulierte HMG-CoA Reduktase umfasst.

6. Verfahren zur Herstellung eines Hefestammes gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 dadurch gekennzeichnet, dass in *Saccharomyces* die Gene *GGPP Synthase* und *Phytoen Synthase, und/oder Phytoen Desaturase und/oder Lycopen Cyclase* eingebracht und exprimiert sowie das Gen *PDR1* überexprimiert oder ein PDR1-Homolog eingebracht und überexprimiert wird.

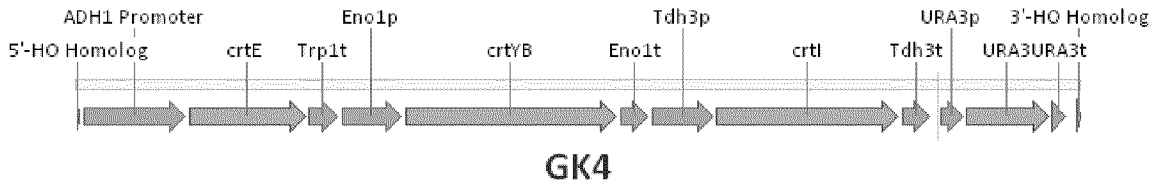
7. Verfahren zur Herstellung von Carotinoiden bei dem ein Hefestamm in an sich bekannter Art und Weise fermentiert wird und das Carotin nach Zellaufschluss isoliert wird, dadurch gekennzeichnet, dass der Hefestamm ein Hefestamm gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 ist.

8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass ein Carotinoid ausgewählt aus der Gruppe Phytoen, beta-Carotin, beta-Cryptoxanthin, Zeaxanthin produziert wird.

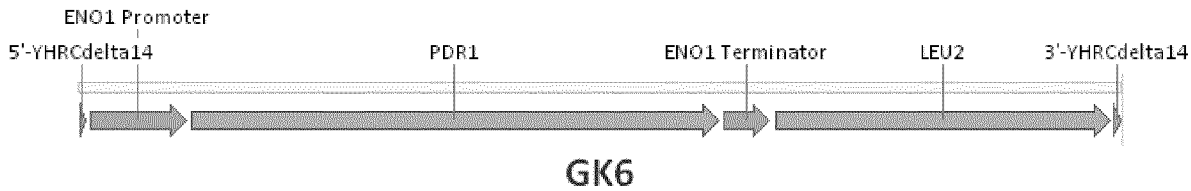
Figur 1: Biosynthese von Squalen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*



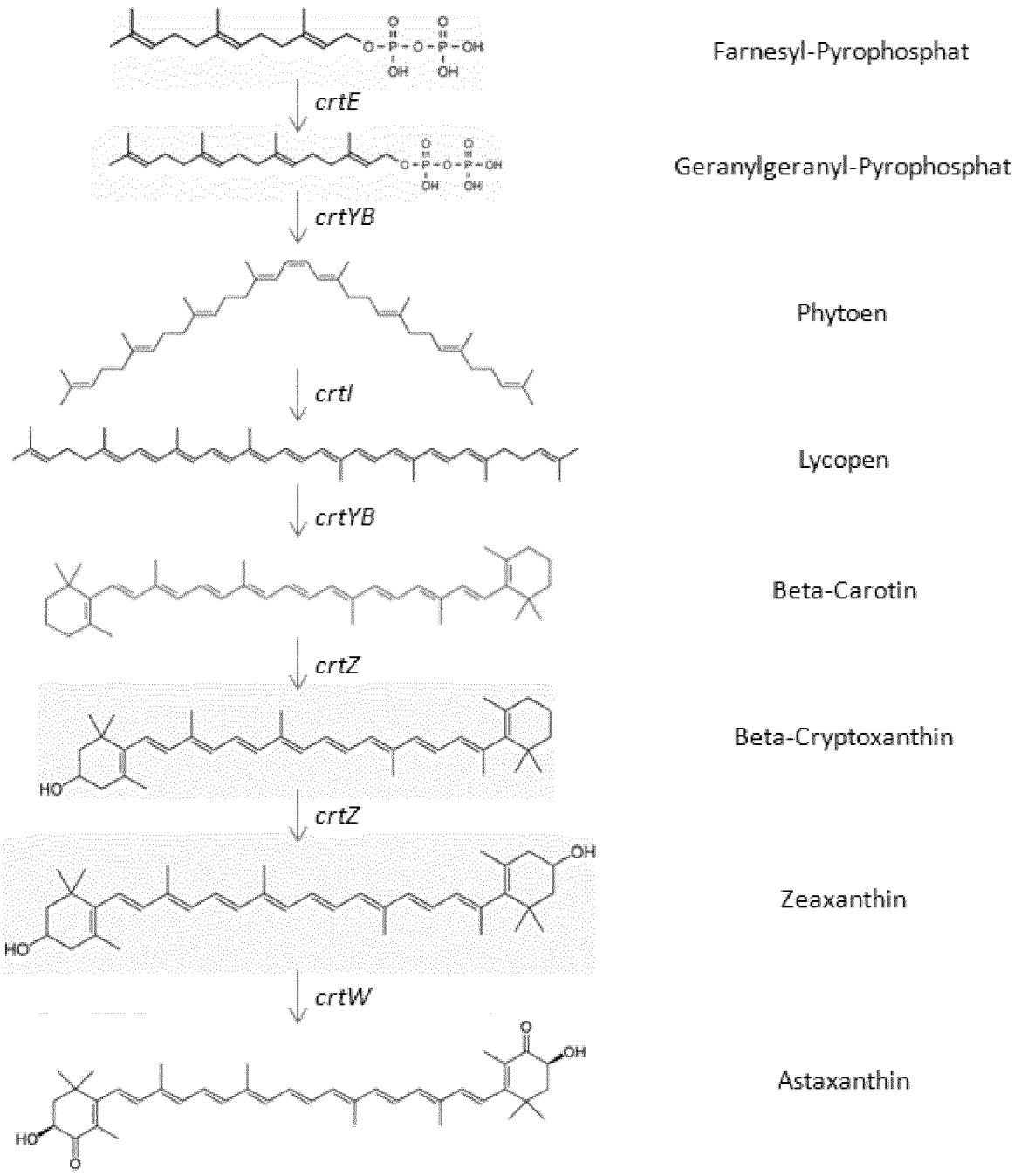
Figur 2: Genkasette 4



Figur 3: Genkasette 6



Figur 4 : Exemplarische Darstellung des Carotinoid-biosyntheseweges in der Hefe *S. cerevisae*.



crtE: GGPP-Synthase
crtYB: Phytoen-Synthase/Lycopene-Cyclase
crtI: Phytoen-Desaturase
crtZ: Carotinoid-Hydroxylase
crtW: Carotinoid-Ketolase

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/060924

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12P23/00
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

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

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RENÉ VERWAAL ET AL: "Heterologous carotenoid production in Saccharomyces cerevisiae induces the pleiotropic drug resistance stress response", YEAST, vol. 27, no. 12, 1 December 2010 (2010-12-01), pages 983-998, XP055200189, ISSN: 0749-503X, DOI: 10.1002/yea.1807 cited in the application the whole document ----- -/--	1-3,7,8

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
8 July 2015	16/07/2015

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Westphal-Daniel, K

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VERWAAL RENE ET AL: "High-level production of beta-carotene in Saccharomyces cerevisiae by successive transformation with carotenogenic genes from Xanthophyllomyces dendrorhous", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 73, no. 13, 1 July 2007 (2007-07-01), pages 4342-4350, XP002587086, ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.02759-06 [retrieved on 2007-05-11] cited in the application the whole document -----	1-3,5,7, 8
X	K. UKIBE ET AL: "Metabolic Engineering of Saccharomyces cerevisiae for Astaxanthin Production and Oxidative Stress Tolerance", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 75, no. 22, 15 November 2009 (2009-11-15), pages 7205-7211, XP055200187, ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.01249-09 the whole document -----	1-3,7,8
A	SCHMIDT-DANNERT C: "ENGINEERING NOVEL CAROTENOIDS IN MICROORGANISMS", CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, LONDON, GB, vol. 11, no. 3, 1 June 2000 (2000-06-01), pages 255-261, XP000985860, ISSN: 0958-1669, DOI: 10.1016/S0958-1669(00)00093-8 cited in the application the whole document -----	1-8
A	MISAWA N ET AL: "Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 59, no. 3, 3 January 1998 (1998-01-03), pages 169-181, XP004113748, ISSN: 0168-1656, DOI: 10.1016/S0168-1656(97)00154-5 cited in the application the whole document -----	1-8

-/--

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LUIS CARLOS MATA-GÓMEZ ET AL: "Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview", MICROBIAL CELL FACTORIES, BIOMED CENTRAL, LONDON, NL, vol. 13, no. 1, 21 January 2014 (2014-01-21), page 12, XP021175878, ISSN: 1475-2859, DOI: 10.1186/1475-2859-13-12 the whole document	1-8
A	H.-F. TSAI ET AL: "Candida glabrata PDR1, a Transcriptional Regulator of a Pleiotropic Drug Resistance Network, Mediates Azole Resistance in Clinical Isolates and Petite Mutants", ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 50, no. 4, 28 March 2006 (2006-03-28) , pages 1384-1392, XP055200558, ISSN: 0066-4804, DOI: 10.1128/AAC.50.4.1384-1392.2006 the whole document	1-8
A	WRIESSNEGGER TAMARA ET AL: "Yeast metabolic engineering - Targeting sterol metabolism and terpenoid forma", PROGRESS IN LIPID RESEARCH, PERGAMON PRESS, PARIS, FR, vol. 52, no. 3, 6 April 2013 (2013-04-06), pages 277-293, XP028553555, ISSN: 0163-7827, DOI: 10.1016/J.PLIPRES.2013.03.001 the whole document	1-8
A	DERISI J ET AL: "Genome microarray analysis of transcriptional activation in multidrug resistance yeast mutants", FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 470, no. 2, 24 March 2000 (2000-03-24), pages 156-160, XP004336932, ISSN: 0014-5793, DOI: 10.1016/S0014-5793(00)01294-1 the whole document	1-8

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2015/060924

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. C12P23/00
ADD.

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C12P

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

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	RENÉ VERWAAL ET AL: "Heterologous carotenoid production in Saccharomyces cerevisiae induces the pleiotropic drug resistance stress response", YEAST, Bd. 27, Nr. 12, 1. Dezember 2010 (2010-12-01), Seiten 983-998, XP055200189, ISSN: 0749-503X, DOI: 10.1002/yea.1807 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ----- -/--	1-3,7,8

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen [ ] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
8. Juli 2015	16/07/2015

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Westphal-Daniel, K

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	VERWAAL RENE ET AL: "High-level production of beta-carotene in Saccharomyces cerevisiae by successive transformation with carotenogenic genes from Xanthophyllomyces dendrorhous", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, Bd. 73, Nr. 13, 1. Juli 2007 (2007-07-01), Seiten 4342-4350, XP002587086, ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.02759-06 [gefunden am 2007-05-11] in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-3,5,7, 8
X	K. UKIBE ET AL: "Metabolic Engineering of Saccharomyces cerevisiae for Astaxanthin Production and Oxidative Stress Tolerance", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 75, Nr. 22, 15. November 2009 (2009-11-15), Seiten 7205-7211, XP055200187, ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.01249-09 das ganze Dokument -----	1-3,7,8
A	SCHMIDT-DANNERT C: "ENGINEERING NOVEL CAROTENOIDS IN MICROORGANISMS", CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, LONDON, GB, Bd. 11, Nr. 3, 1. Juni 2000 (2000-06-01), Seiten 255-261, XP000985860, ISSN: 0958-1669, DOI: 10.1016/S0958-1669(00)00093-8 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-8
A	MISAWA N ET AL: "Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, Bd. 59, Nr. 3, 3. Januar 1998 (1998-01-03) , Seiten 169-181, XP004113748, ISSN: 0168-1656, DOI: 10.1016/S0168-1656(97)00154-5 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-8

-/--

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	LUIS CARLOS MATA-GÓMEZ ET AL: "Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview", MICROBIAL CELL FACTORIES, BIOMED CENTRAL, LONDON, NL, Bd. 13, Nr. 1, 21. Januar 2014 (2014-01-21), Seite 12, XP021175878, ISSN: 1475-2859, DOI: 10.1186/1475-2859-13-12 das ganze Dokument ----	1-8
A	H.-F. TSAI ET AL: "Candida glabrata PDR1, a Transcriptional Regulator of a Pleiotropic Drug Resistance Network, Mediates Azole Resistance in Clinical Isolates and Petite Mutants", ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Bd. 50, Nr. 4, 28. März 2006 (2006-03-28), Seiten 1384-1392, XP055200558, ISSN: 0066-4804, DOI: 10.1128/AAC.50.4.1384-1392.2006 das ganze Dokument ----	1-8
A	WRIESSNEGGER TAMARA ET AL: "Yeast metabolic engineering - Targeting sterol metabolism and terpenoid forma", PROGRESS IN LIPID RESEARCH, PERGAMON PRESS, PARIS, FR, Bd. 52, Nr. 3, 6. April 2013 (2013-04-06), Seiten 277-293, XP028553555, ISSN: 0163-7827, DOI: 10.1016/J.PLIPRES.2013.03.001 das ganze Dokument ----	1-8
A	DERISI J ET AL: "Genome microarray analysis of transcriptional activation in multidrug resistance yeast mutants", FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Bd. 470, Nr. 2, 24. März 2000 (2000-03-24) , Seiten 156-160, XP004336932, ISSN: 0014-5793, DOI: 10.1016/S0014-5793(00)01294-1 das ganze Dokument ----	1-8