



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)

wird ein Verfahren zur Herstellung von Flavanonglykosid-Dihydrochalkonen, umfassend die Schritte: (a) Bereitstellen eines transgenen Mikroorganismus, enthaltend (i) einen ersten Nukleinsäure-Abschnitt (A) enthaltend ein für eine bakterielle Chalkonisomerase kodierendes Gen, sowie (ii) einen zweiten Nukleinsäure-Abschnitt (B), enthaltend ein für eine bakterielle Enoat-Reduktase kodierendes Gen, (b) Hinzufügen eines oder mehrere Flavanonglykoside zu dem transgenen Mikroorganismus, (c) Kultivierung des transgenen Mikroorganismus unter Bedingungen, die die gleichzeitig Isomerisierung und Reduktion des Flavanonglykosids zum Flavanonglykosid-Dihydrochalkon ermöglichen, sowie gegebenenfalls (d) Isolierung und Aufreinigung des Endproduktes, wobei der Nukleinsäure-Abschnitt (A) (1) eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:1 darstellt, bei der der Nukleinsäure Abschnitt (A') gemäß SEQ ID NO:3 herausgeschnitten worden ist, oder (2) eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 darstellt, bei der der Aminosäure-Abschnitt (A') gemäß SEQ ID NO:4 herausgeschnitten worden ist.

5 VERFAHREN ZUR BIOTECHNOLOGISCHEN HERSTELLUNG VON FLAVANONGLYKOSID DIHYDROCHALKONEN

[0001] GEBIET DER ERFINDUNG

10 [0002] Die Erfindung befindet sich auf dem Gebiet der Biotechnologie und betrifft ein Verfahren bei dem man Flavanonglykoside ohne chemische Zwischenschritte in die entsprechenden Dihydrochalkone umwandelt, einen entsprechenden Mikroorganismus, einen Vektor und eine Wirtszelle.

15 [0003] STAND DER TECHNIK

[0004] Im Rahmen eines Forschungsprogramms des US Departments of Agriculture zur Verminderung des Bittergeschmacks in Zitrusfrüchten wurden Mitte der 60er Jahre des vergangenen Jahrhunderts eine Reihe von Flavanonglykosiden wie beispielsweise Naringin, Hesperidin und Narirutin als die entscheidenden Bitterstoffe erkannt. Im Weiteren wurde gefunden, dass die Hydrierung der Flavanonglykoside zu Dihydrochalkonen zu Stoffen führt, die an der Nachweisgrenze des Süßungseffektes bis zu 1800mal süßer als Zucker schmecken; tauscht man Zucker gegen diese Dihydrochalkone im Gewichtsverhältnis 1:1 aus, erweisen sich die Dihydrochalkone immer noch um mindestens den Faktor 300 effizienter. Naringindihydrochalkon, Hesperidindihydrochalkon und Neohesperidindihydrochalkon zählen heute nicht nur zu den stärksten Süßstoffen, sondern sind auch in Besonderen dazu geeignet, den Bittergeschmack von Zitrusstoffen zu maskieren.

[0005] Bestimmte Dihydrochalkonglykoside lassen sich durch Extraktion aus Beeren, speziell aus *Malus spp.* erhalten. Das Verfahren ist jedoch aufwendig, kostspielig und zudem saisonabhängig, so dass es technisch keine Bedeutung hat.

30 [0006] Ausgehend von den Flavanonglykosiden erfolgt die Herstellung der Dihydrochalkone heute durch katalytische Reduktion unter stark basischen Bedingungen oder durch eine Friedel-Crafts-artige Acylierung von Phenolen mit Dihydrozimtsäuren. Auch wenn die Synthese in befriedigenden Ausbeuten erfolgt und industriell etabliert ist, weist sie jedoch einen entscheidenden Nachteil auf: es handelt sich um einen chemischen Herstellungsprozess, was bedeutet, dass das Endprodukt aus regulatorischen Gründen nicht als natürlich deklariert werden kann.

[0007] In diesem Zusammenhang sei auf die folgenden Druckschriften aus dem Stand der Technik hingewiesen:

40 [0008] Die EP 2692729 A1 (SYMRISE) offenbart ein Verfahren zur Herstellung eines Dihydrochalkons, unter Verwendung eines transgenen Mikroorganismus, umfassend folgende Schritte:

te: Bereitstellen eines transgenen Mikroorganismus, enthaltend einen Nukleinsäure-Abschnitt (a), umfassend oder bestehend aus einem für eine bakterielle Chalconisomerase kodierenden Gen, und/oder einen Nukleinsäure-Abschnitt (a'), umfassend oder bestehend aus einem für eine pflanzliche Chalconisomerase kodierenden Gen, sowie einen Nukleinsäure-Abschnitt (b), umfassend oder bestehend aus einem für eine bakterielle Enoat-Reduktase kodierenden Gen, Hinzufügen von einem oder mehreren Flavanonen, und/oder von einer oder mehreren Vorstufen oder einem oder mehreren Derivaten davon, zu dem transgenen Mikroorganismus und Kultivieren des transgenen Mikroorganismus unter Bedingungen, die die Umsetzung des bzw. der Flavanone und/oder der Vorstufe(n) oder des Derivats bzw. der Derivate davon, zu einem Dihydrochalkon ermöglichen sowie optional: Isolieren sowie gegebenenfalls Aufreinigen des Dihydrochalkons, insbesondere von Phloretin.

[0009] Der Aufsatz von GALL et al. mit dem Titel „*Enzymatische Umsetzung von Flavonoiden mit einer bakteriellen Chalconisomerase und einer Enoatreduktase*“ (**ANGEWANDTE CHEMIE, 2014, 126(5), S. 1463-1466**) beschreibt die Identifizierung und die rekombinante Expression der Chalkonisomerase und einer Enoat-Reduktase aus dem anaeroben Bakterium *Eubacterium ramulus*. Der beide Enzyme exprimierende *E.-coli* Stamm kann zur Durchführung der Umwandlung verschiedener Flavanone zu ihren jeweiligen Dihydrochalconen eingesetzt werden.

[0010] Gegenstand der **US 2013/0136839 (NUTRINOVA)** ist eine Süßungsmittelzusammensetzung, die einen Süßstoff und mindestens einen geschmacksmaskierenden Stoff. Unter den möglichen verschiedenen einsetzbaren geschmacksmaskierenden Stoffen ist Naringindihydrochalkon zu finden.

[0011] In der **EP 2529633 A1 (SYMRISE)** wird schließlich eine oral konsumierbare Zubereitung, die unter anderen Naringindihydrochalkon, und/oder Neohesperidindihydrochalkon umfassen kann.

[0012] Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung hat somit darin bestanden, ein Verfahren bereitzustellen, mit dessen Hilfe Flavanonglykoside rasch und in hohen Ausbeuten auf biotechnologischem Verfahren in die entsprechenden Dihydrochalkone überführt werden können, wobei chemische Zwischenschritte zwingend unterbleiben sollten.

[0013] BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

Ein erster Gegenstand der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Flavanonglykosid-Dihydrochalkonen, umfassend die Schritte:

(a) Bereitstellen eines transgenen Mikroorganismus, enthaltend

- (i) einen ersten Nukleinsäure-Abschnitt (A) enthaltend ein für eine bakterielle Chalkonisomerase kodierendes Gen, sowie
- (ii) einen zweiten Nukleinsäure-Abschnitt (B), enthaltend ein für eine bakterielle Enoat-Reduktase kodierendes Gen,

wobei der Nukleinsäure-Abschnitt (A)

- (1) eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:1 darstellt, bei der der Nukleinsäure-Abschnitt (A') gemäß SEQ ID NO:3 herausgeschnitten worden ist, oder

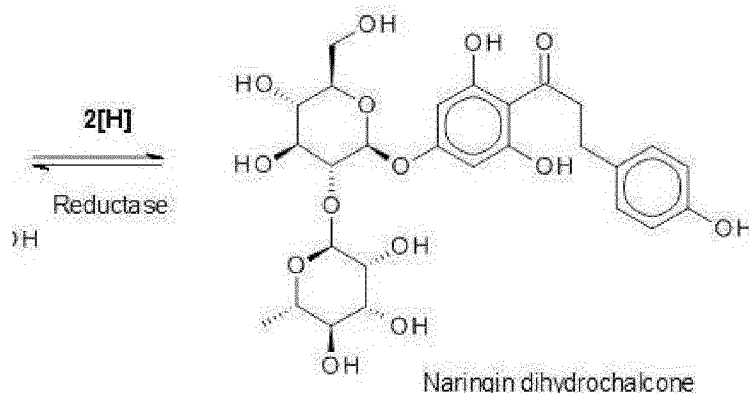
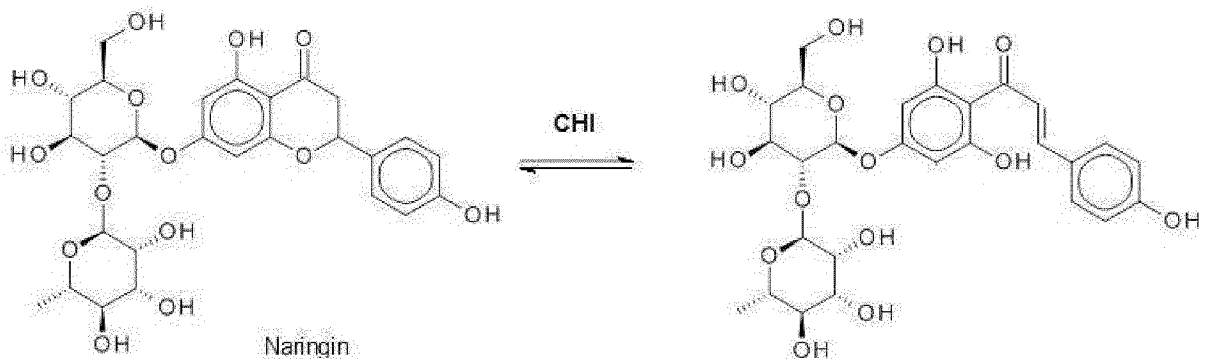
(2) eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 darstellt, bei der der Aminosäure-Abschnitt (A') gemäß SEQ ID NO:4 herausgeschnitten worden ist,

(b) Hinzufügen eines oder mehrere Flavanonglykoside zu dem transgenen Mikroorganismus,

(c) Kultivierung des transgenen Mikroorganismus unter Bedingungen, die die gleichzeitige Isomerisierung und Reduktion des Flavanonglykosids zum Flavanonglykosid-Dihydrochalkon ermöglichen, sowie gegebenenfalls

(d) Isolierung und Aufreinigung des Endproduktes.

[0014] Überraschenderweise wurde gefunden, dass durch Einbau von zwei unterschiedlichen Nukleinsäure-Abschnitten, die einmal ein für eine bakterielle Chalkonisomerase und zum anderen ein für eine bakterielle Enoat-Reduktase kodierendes Gen enthalten in einen geeigneten Mikroorganismus, vorzugsweise einen fakultativ anaeroben Mikroorganismus ein System zur Verfügung steht, welches bei Zugabe von Flavanonglykosiden und Kultivierung gleichzeitig die Isomerisierung des Flavanonglykosids zum Chalkon und die Reduktion des Chalkons zum Dihydrochalkons in kurzen Zeiten und ausgezeichneten Ausbeuten möglich macht, wie dies am Beispiel der Umsetzung des Flavanonglykosids Naringin zu Naringindihydrochalkon (= Naringin dihydrochalcone) exemplarisch dargestellt wird:



[0015] Da das gesamte Verfahren nur durch enzymatische/fermentative Prozesse auskommt, dürfen die so erhaltenen Flavanonglykosid-Dihydrochalkone als natürlich bezeichnet werden.

5 [0016] CHALKONISOMERASEN

[0017] Eine „Chalkonisomerase“ (CHI) im Sinne der vorliegenden Erfindung ist ein Enzym, das die Reaktion eines Flavanons zum Chalkon katalysiert. Insbesondere katalysiert die CHI die Reaktion von Naringin zu Naringinchalkon.

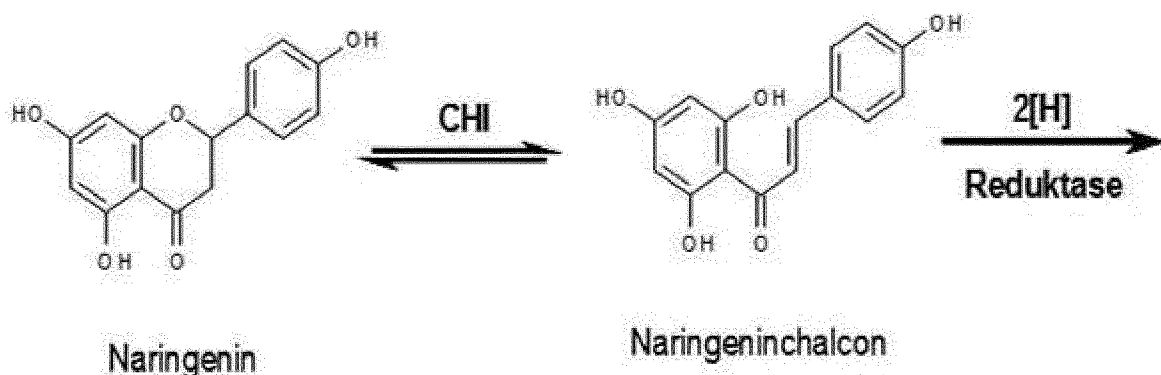
10 [0018] In einer konkreten Ausführungsform der Erfindung ist das vorliegende biotechnologische Verfahren dadurch gekennzeichnet, dass eine bakterielle Chalkonisomerase in Kombination mit einer ebenfalls bakteriellen Enoat-Reduktase, vorzugsweise aus dem gleichen Bakterium, in einen transgenen Mikroorganismus eingebracht wird, der daraufhin in der Lage ist, die gewünschten Flavanonglykosid-Dihydrochalkone, insbesondere Naringin Dihydrochalkon zu bilden.

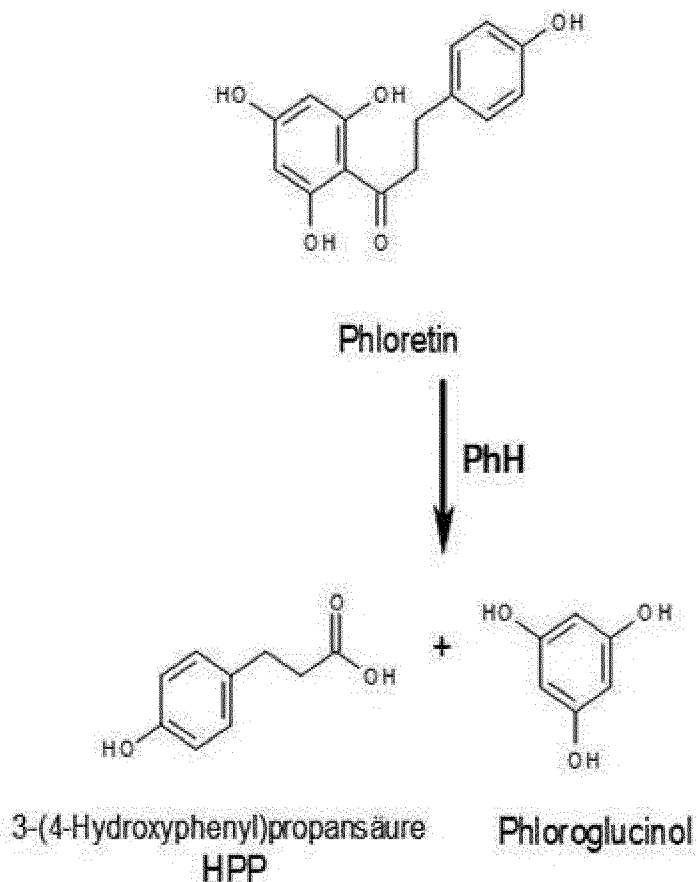
15 [0019] Zu diesem Zweck kommt als erstes und insbesondere eine bakterielle Chalkonisomerase in Betracht, die aus einem Mikroorganismus aus dem Phylum der Firmicutes stammt, vorzugsweise der Klasse Clostridia, insbesondere der Ordnung Clostridiales wobei hierunter der anaerobe Organismus *Eubacterium ramulus* besonders bevorzugt ist.

20 [0020] Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung besonders bevorzugt ist die Verwendung einer Chalkonisomerase, die eine, mehrere oder sämtliche der folgenden Eigenschaften aufweist:

K_M [$\mu\text{mol/l}$]	V_{max} [U/mg]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat} / K_M [$\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]
36,83	107,3	416,7	$1,13 \cdot 10^7$

25 [0021] Aus dem Stand der Technik ist bekannt, dass der anaerobe Mikroorganismus *Eubacterium ramulus* in der Lage ist, Naringenin abzubauen, wobei intermediär Phloretin gebildet wird. Das intermediär gebildete Phloretin wird in *Eubacterium ramulus* unmittelbar weiter verstoffwechselt (vgl. *Schneider et al*, Anaerobic degradation of flavonoids by *Eubacterium ramulus*, **Arch Microbiol (2000) 173 : 71–75**), wie in dem folgenden Reaktionsschema dargestellt ist (siehe insbesondere die durch die Phloretinhydrolase (PhH) vermittelte Reaktion):





[0022] Im Stand der Technik sind zwar unterschiedliche Einsatzmöglichkeiten von Enzymsystemen und Methoden der mikrobiellen Biotransformation beschrieben; bekannt ist beispielsweise die Möglichkeit einer einfachen Reduktion von Doppelbindungen mittels Hefen (z.B. *Saccharomyces*). Enzymatische Etherspaltungen wurden bisher jedoch kaum untersucht.

[0023] Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung sei grundsätzlich auf folgende Veröffentlichungen verwiesen: *Schoefer et al*, Anaerobic Degradation of Flavonoids by *Clostridium orbiscindens*, **Appl. Environ. Microbiol.**, Oct. 2003, p. 5849–5854; und *Herles et al*, “First bacterial chalcone isomerase isolated from *Eubacterium ramulus*”, **Arch Microbiol** (2004) 181: 428–434. Erkenntnisse im Zusammenhang mit dem Abbau von Lignin sind beispielsweise von Masai et al. beschrieben worden (Masai et al., 1993; Otsuka et al., 2003; s. auch JP 2002034557).

[0024] In WO 2006 010117 A1 (KOFFAS) und WO 2005 084305 A1 (SCHMIDT-DANERT) wird zudem die Anwendung heterologer Expression zur Bildung von Flavonoiden beschrieben. Darin werden (ausschließlich) pflanzliche Gene beschrieben, die für eine heterologe Expression verschiedener Substanzen (ausgehend von L-Phenylalanin, Tyrosin und Zimtsäure) offenbart.

[0025] Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wurde jedoch festgestellt, dass Chalkonisomerasen im Allgemeinen und die CHI ex *E. ramulus* nicht immer befriedigende

Produktausbeuten zeigen, wenn statt der Aglykone die entsprechenden Glykoside eingesetzt werden. Ein besonderer Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung hat somit darin bestanden, gezielte Veränderungen an dem Enzym vorzunehmen, so dass nun in praktisch gleicher Weise Aglykone oder die entsprechende Glykoside eingesetzt und die entsprechenden Dihydrochalkone dann auch in kurzer Zeit und in zufriedenstellenden Ausbeuten exprimiert werden.

[0026] Eine besondere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft demnach ein Verfahren, welches sich dadurch auszeichnet, dass der in den transgenen Mikroorganismus eingebrachte Nukleinsäure-Abschnitt (A) eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:1 enthält, bei der der Nukleinsäure-Abschnitt (A') gemäß SEQ ID NO:3 herausgeschnitten worden ist.

[0027] Grundsätzlich geeignet sind auch solche Nukleinsäureabschnitte, die mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäureabschnitten (A-A') zu mindestens 50 %, vorzugsweise zu mindestens 60 und insbesondere zu mindestens 80 % übereinstimmen, auch wenn sich mit diesen Sequenzen nicht die gleichen vorteilhaften Expressionszeiten und Expressionsausbeuten erzielen lassen.

[0028] Mutatis mutandis ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung ein Verfahren, bei dem die bakterielle Chalkonisomerase eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:1 enthält, bei der der Nukleinsäure-Abschnitt (A') gemäß SEQ ID NO:3 herausgeschnitten worden ist.

[0029] Eine besondere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft demnach ein Verfahren, welches sich dadurch auszeichnet, dass der in den transgenen Mikroorganismus exprimierte Aminosäure-Abschnitt (A) eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 enthält, bei der der Aminosäure-Abschnitt (A') gemäß SEQ ID NO:4 herausgeschnitten worden ist.

[0030] Grundsätzlich geeignet sind auch solche Aminosäureabschnitte, die mit den erfindungsgemäßen Aminosäureabschnitten (A-A') zu mindestens 50 %, vorzugsweise zu mindestens 60 % und insbesondere zu mindestens 80 % übereinstimmen, auch wenn sich mit diesen Sequenzen nicht die gleichen vorteilhaften Expressionszeiten und Expressionsausbeuten erzielen lassen.

[0031] Mutatis mutandis ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung ein Verfahren, bei dem die bakterielle Chalkonisomerase eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 enthält, bei der der Aminosäure-Abschnitt (A') gemäß SEQ ID NO:4 herausgeschnitten worden ist.

[0032] Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist die „Aminosäuresequenz-Identität“ bevorzugt anhand des Waterman-Smith-Algorithmus mit einer Lückeneröffnungs-Strafe („gap open penalty“) von 10, einer Lückenvergrößerungsstrafe („gap extension penalty“) von 0,5 und der BLOSUM62-Matrix zu bestimmen (bezüglich des Waterman-Smith-Algorithmus siehe beispielsweise *Smith, T.F. and Waterman, M.S., „Identification of common molecular sub-sequences“, Journal of Molecular biology (1981), 147:195-197; online implementiert über die entsprechende Werkzeugseite des EMBL). Die vorgelegten Nukleotid-Sequenzen wurden mit Hilfe der Software BISSAP des Europäischen Patentamtes gemäß WIPO Standard 25 erzeugt*

[0033] Das Entfernen des genannten Abschnitts aus der Gesamtsequenz kann beispielsweise mit der FastCloning Methode durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wird eine PCR mit folgenden Primern durchgeführt:

[0034] Forward Primer: 5'-GATCCCGGCAGCAGCAGAAGGAAATCC-3'

[0035] Reverse Primer: 5'-GGATTCCTTCTGCTGCTGCCGGGATC-3'

[0036] Anschließend wird das Ausgangs-Plasmid mit DpnI. Nach erfolgreicher Klonierung kann das so erhaltene Plasmid pET28_CHI_ΔLid zusammen mit dem zweiten Plasmid pET22_ERED (wie im Folgenden näher erläutert) in einen Mikroorganismus, hier vorzugsweise *E. coli* BL21 in an sich bekannter Weise transformiert werden.

[0037] ENOAT REDUKTASEN

[0038] Eine „Enoat-Reduktase“ (ERED) im Sinne der vorliegenden Erfindung ist ein Enzym, das die Dehydrierung bestimmter Verbindungen katalysiert, insbesondere die Reaktion von Naringeninglykosidchalkon zu Naringeninglykosiddihydrochalkon.

[0039] Als zweite und ebenfalls bevorzugte Ausführungsform kommt eine bakterielle Enoat-Reduktase aus einem Mikroorganismus aus dem Phylum der Firmicutes in Betracht, vorzugsweise der Klasse Clostridia, insbesondere der Ordnung Clostridiales, wobei hierunter der anaerobe Organismus *Eubacterium ramulus* besonders bevorzugt ist. Insgesamt bevorzugt ist die Doppeltransformation sowohl der Chalkonisomerase als auch der Enoat-Reduktase ex *Eubacterium ramulus* in einen geeigneten Mikroorganismus, vorzugsweise *E. coli*.

[0040] Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung bevorzugt ist die Verwendung einer Enoat-Reduktase, die eine Proteingröße von 74,455 kDa aufweist und/oder sowohl in der löslichen als auch in der unlöslichen Proteinfraction nach bis zu 20h unter anoxischen Bedingungen bei verschiedenen Temperaturen exprimiert.

[0041] Eine weitere besondere Ausführungsform der Erfindung betrifft daher ein Verfahren welches sich dadurch auszeichnet, dass der in den transgenen Mikroorganismus eingebrachte Nukleinsäure-Abschnitt (B) eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:5 oder SEQ ID NO:7 darstellt.

[0042] Mutatis-mutandis ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung ein Verfahren, bei dem die bakterielle Enoat-Reduktase eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:5 oder SEQ ID NO:7 enthält.

[0043] Eine weitere besondere Ausführungsform der Erfindung betrifft daher ein Verfahren welches sich dadurch auszeichnet, dass der in den transgenen Mikroorganismus exprimierte Aminosäure-Abschnitt (B) eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:6 darstellt.

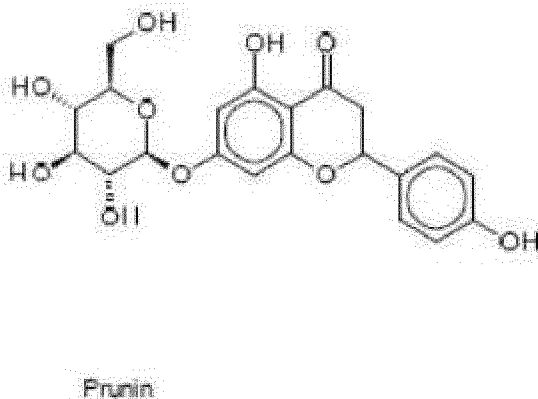
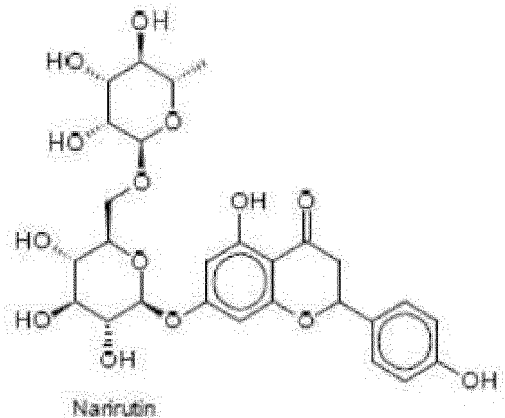
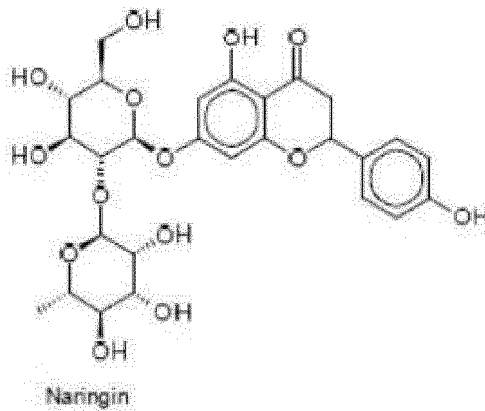
[0044] Grundsätzlich geeignet sind auch solche Aminosäureabschnitte, die mit den erfindungsgemäßen Aminosäureabschnitten (B) zu mindestens 50 %, vorzugsweise zu mindestens 60 % und insbesondere zu mindestens 80 % übereinstimmen, auch wenn sich mit diesen Sequenzen nicht die gleichen vorteilhaften Expressionszeiten und Expressionsausbeuten erzielen lassen.

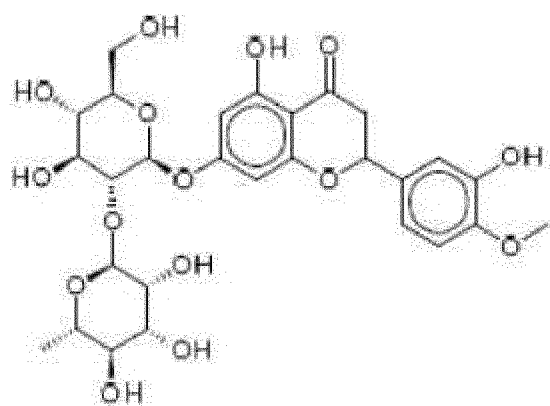
[0045] Mutatis-mutandis ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung ein Verfahren, bei dem die bakterielle Enoat-Reduktase eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:6 enthält.

[0046] FLAVANONGLYKOSIDE

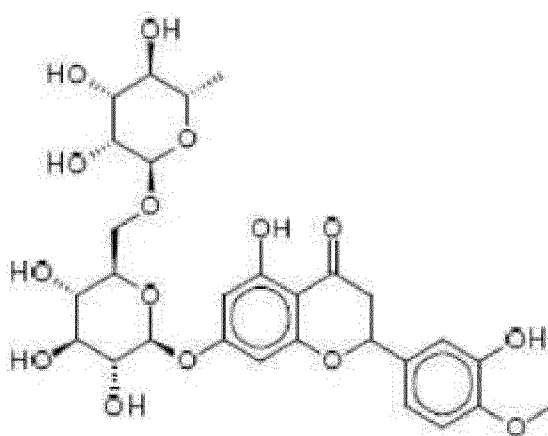
[0047] Im Sinne der vorliegenden Erfindung kommen als Flavanonglykoside, die zu den entsprechenden Flavanonglykosid-Dihydrochalkonen umgesetzt werden sollen, die folgenden Stoffe in Betracht:

- 5 **[0048]** Naringin, Narirutin, Prunin (Naringin-7-O-glucosid), Hesperidin, Neohesperidin, Hesperetin-7-O-glucosid, Eriodictyolglycoside wie Eriocitrin, Neoeriocitrin, Eriodictyol-7-O-glucosid, Homoeriodictyolglycoside wie Homoeriodictyol-7-O-glucosid, Sterubinglycoside, Sakuranetinglycoside, Isosakuranetinglycoside, 4',7-Dihydroxy-flavanonglykoside, 4',7-Dihydroxy-3'-methoxy-flavanonglycoside, 3',7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavanonglycoside, 10 3',4',7-Trihydroxy-flavanonglycoside, wobei die Flavanone bezüglich der 2-Position des Flavanongerüsts als (S)-, als (R)-Enantiomer, als Racemat oder als beliebige Mischung der beiden Enantiomere vorliegen können. Im Folgenden sind einige der bevorzugt einzusetzenden Flavanone exemplarisch abgebildet:

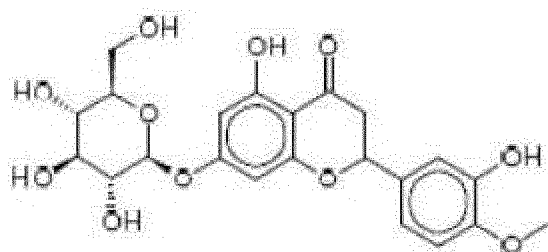




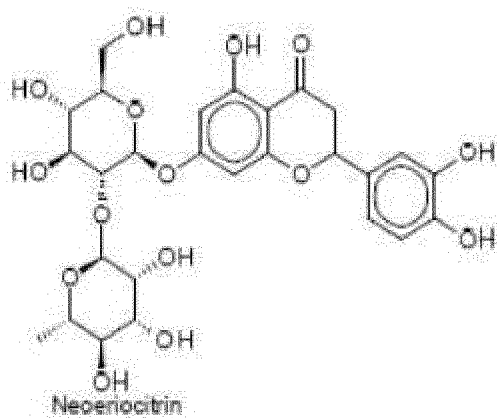
Neohesperidin



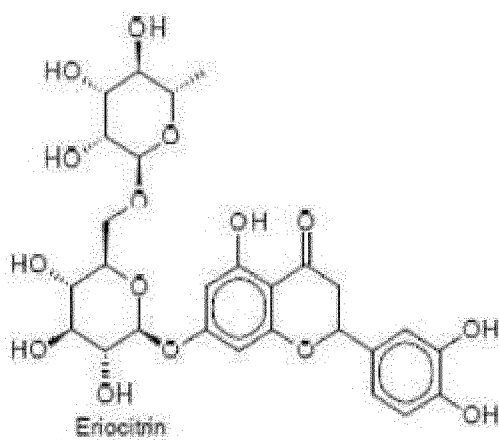
Hesperidin



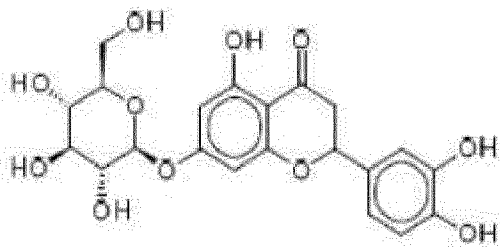
Hesperetin-7-O-glucosid



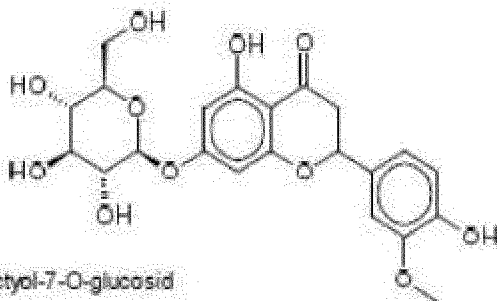
Neohesperidin



Eriocitrin

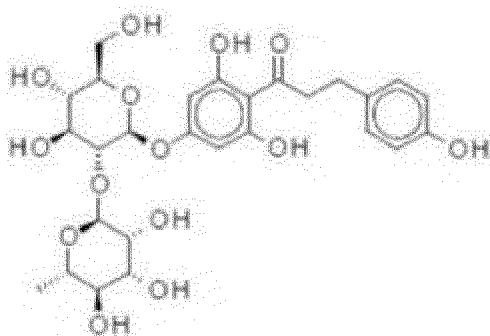


Eriodictyol-7-O-glucosid

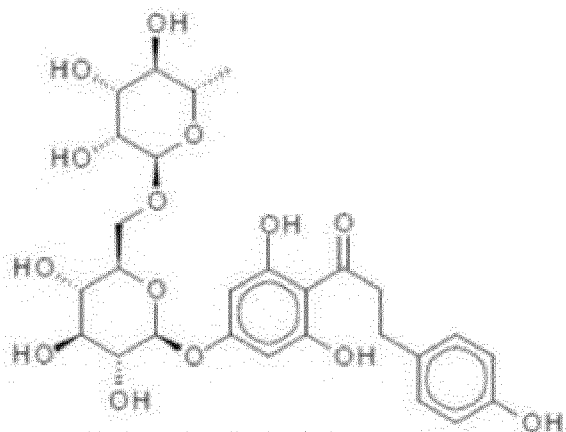


Homoeriodictyol-7-O-glucosid

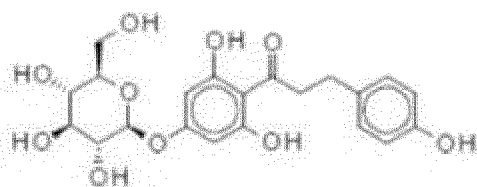
- 5 **[0049]** Diese lassen sich gemäß dem Verfahren der Erfindung in die entsprechenden Dihydrochalkone umwandeln, die nachstehend wiedergegeben sind:



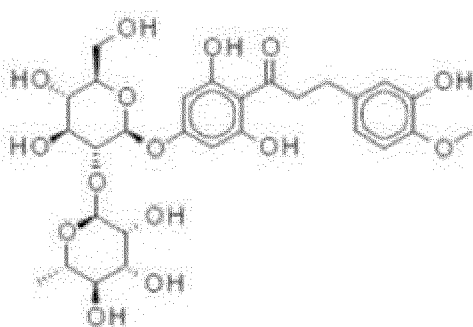
Naringindihydrochalkon



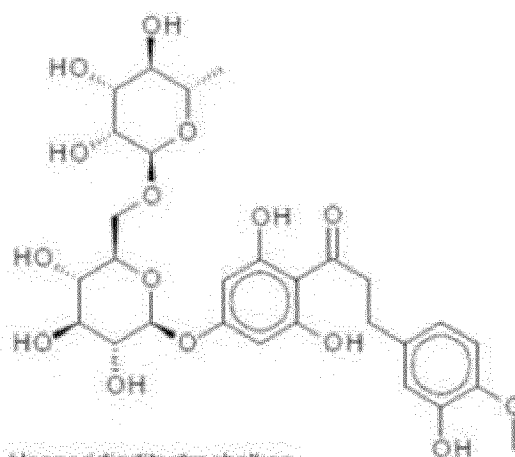
Narirutindihydrochalkon



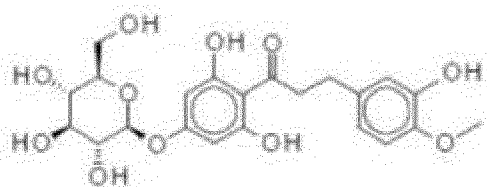
Prunindihydrochalcon = Trilobatin



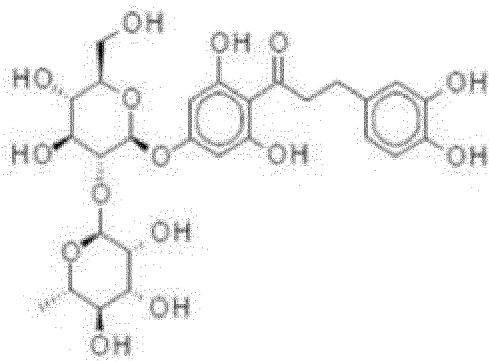
Neohesperidindihydrochalcon



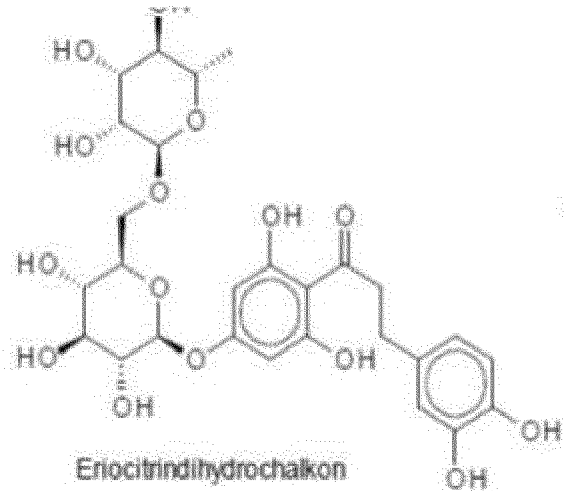
Hesperidindihydrochalcon



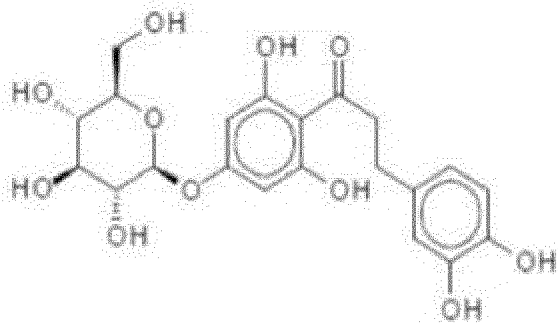
Hesperetin-7-O-glucosid-dihydrochalcon



Neocitrindihydrochalcon

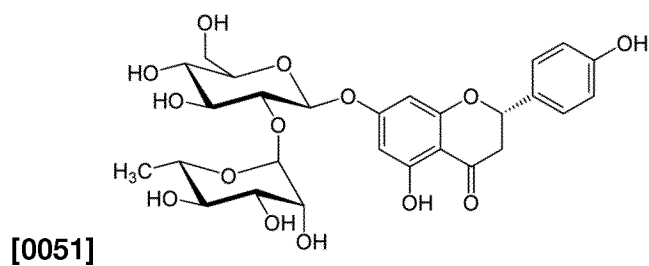


Eriocitrindihydrochalcon



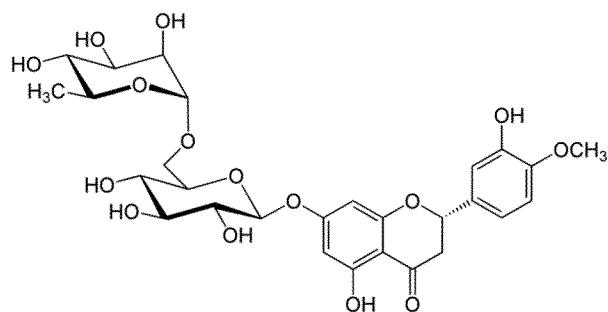
Eriodictyol-7-O-glucosid-dihydrochalcon

- 5 **[0050]** Besonders bevorzugt – weil kommerziell von erheblicher Bedeutung und in besonders kurzen Zeiten und hohen Ausbeuten erhältlich – ist die Umsetzung der folgenden Flavononglykoside zu den entsprechenden Dihydrochalkonen:

**[0051]**

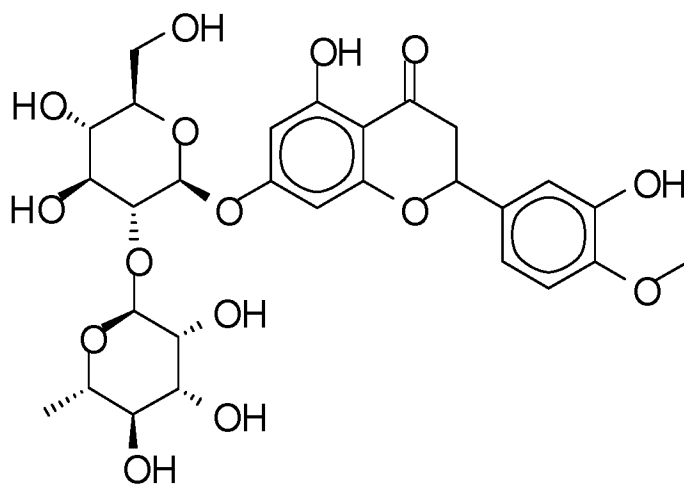
Naringin

[0052]



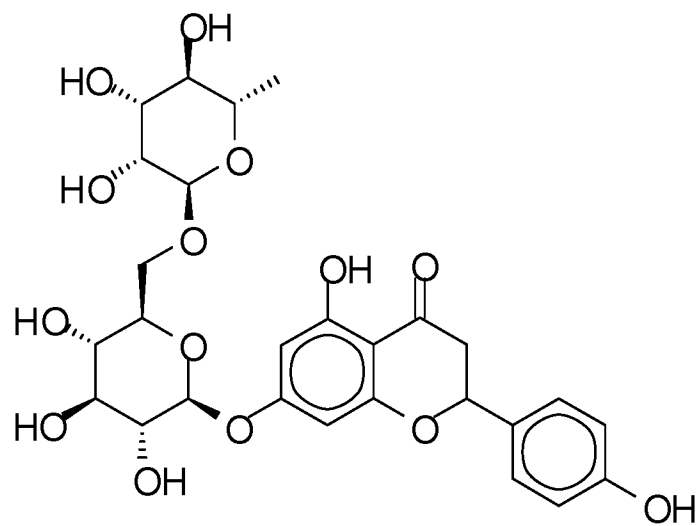
Hesperidin

[0053]

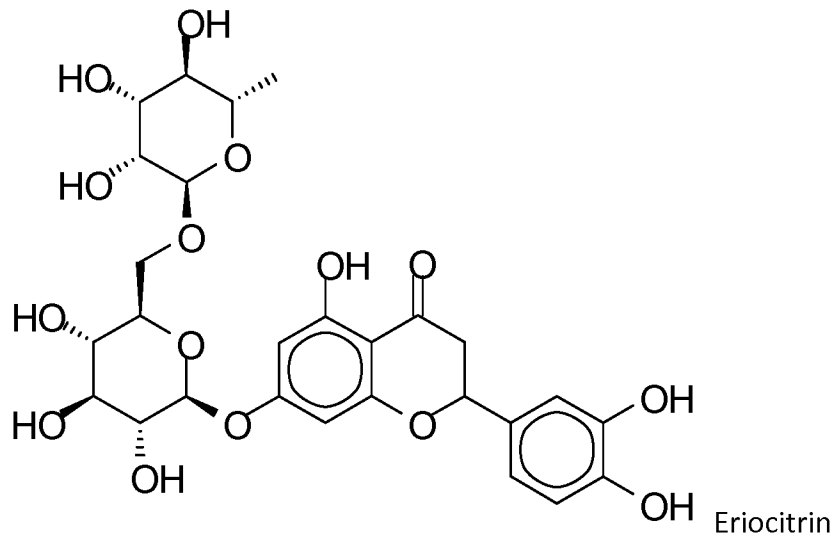


Neohesperidin

[0054]



Narirutin



[0056] KULTIVIERUNG; EXPRESSION UND ISOLIERUNG

[0057] Wie oben beschrieben wird bzw. werden in Schritt (ii) eines erfindungsgemäßen Verfahrens ein oder mehrere Flavanonglykoside zu dem transgenen Mikroorganismus hinzugefügt, wobei der transgene Mikroorganismus unter Bedingungen kultiviert wird, die die Umsetzung des bzw. der Flavanonglykoside ermöglichen.

[0058] Gemäß einer bevorzugten Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens werden die transgenen Mikroorganismen zunächst, d.h. vor Schritt (ii), unter aeroben Bedingungen, vorzugsweise bis zum Erreichen einer maximalen Biomassenkonzentration, kultiviert. Dabei sollte die OD₆₀₀ bevorzugt wenigstens im Bereich von 1 bis 15 oder darüber liegen, vorzugsweise im Bereich von 5 bis 300, insbesondere im Bereich von 10 bis 275, bevorzugt im Bereich von 15 bis 250. Anschließend werden die Mikroorganismen in Schritt (ii) bevorzugt unter anaeroben Bedingungen kultiviert, wobei die Expression der gewünschten Aminosäuresequenzen bzw. der gewünschten Enzyme auf Basis der eingeschleusten Nukleinsäure-Abschnitte bzw. der eingeschleusten Transgene erfolgt, beispielsweise angeregt mittels Induktion durch IPTG und/oder Lactose (bei Verwendung eines entsprechenden, geeigneten Promotors bzw. eines entsprechenden, geeigneten Expressionssystems).

[0059] Grundsätzlich ist es erfindungsgemäß bevorzugt, wenn die Inkubation in Schritt (ii) zumindest teilweise oder vollständig unter anaeroben Bedingungen erfolgt.

[0060] Je nach Mikroorganismus kann der Fachmann in Schritt (ii) für die Zwecke der vorliegenden Erfindung geeignete Umgebungsbedingungen schaffen und insbesondere ein geeignetes (Kultivierungs-)Medium bereitstellen. Die Kultivierung erfolgt vorzugsweise in LB- oder TB-Medium. Alternativ kann ein (komplexeres) Medium bestehend oder umfassend pflanzliche Rohstoffe, insbesondere aus Zitrus-, Grapefruit- und Orange-Pflanzen, verwendet werden. Die Kultivierung erfolgt beispielsweise bei einer Temperatur von mehr als 20 °C, bevorzugt von mehr als 25 °C, insbesondere von mehr als 30 °C (bevorzugt im Bereich von 30 bis 40 °C), was insbesondere die Bildung von Naringin Dihydrochalcon begünstigen bzw. die Ausbeute erhöhen kann. Weiterhin kann auch eine Temperatur zur Induktion (vgl. oben) von weniger als 40 °C, insbesondere von weniger als 35 °C (bevorzugt im Bereich von 20 bis 30 °C), die Bildung von Naringin Dihydrochalcon begünstigen bzw. die Ausbeute erhöhen.

[0061] Die Flavanonglykoside werden bezogen auf das (Kultivierungs-) Medium, das die transgenen Mikroorganismen enthält, in Schritt (ii) vorzugsweise in einer Menge von 0,1 mM bis 100 mM (mMol / L), bevorzugt von 0,5 bis 95 mM, besonders bevorzugt von 1 bis 90 mM, zu dem transgenen Mikroorganismus hinzugefügt. Hierbei können geeignete (Ko-)Solventien zum Einsatz kommen.

[0062] Falls zur Induktion (z.B. des lac-operons) ein oder mehrere geeignete Induktoren, z.B. IPTG oder Lactose, verwendet werden, ist es bevorzugt, den Induktor bezogen auf das (Kultivierungs-)Medium, das die transgenen Mikroorganismen enthält, in Schritt (ii) in einer Menge von 0,001 bis 1 mM, bevorzugt von 0,005 bis 0,9 mM, besonders bevorzugt von 0,01 bis 0,8 mM, einzusetzen, da hierbei besonders gute Ausbeuten erzielt werden können.

[0063] Zu Isolierung oder Aufreinigung der exprimierten Flavanonglykosid-Dihydrochalkone kann beispielsweise Extraktionen mit organischen Lösemitteln vorgenommen werden. Diese sind bevorzugt ausgewählt aus der folgenden Liste: Isobutan, 2-Propanol, Toluol, Methylacetat, Cyclohexan, 2-Butanol, Hexan, 1-Propanol, Light petroleum, 1,1,1,2-Tetrafluorethan, Methanol, Propan, 1-Butanol, Butan, Ethylmethylketon, Ethylacetat, Diethylether, Ethanol, Dibutylether, CO₂, tert. Butylmethylether, Aceton, Dichloromethan und N₂O. Besonders bevorzugt sind solche Lösungsmittel, die mit Wasser eine optisch erkennbare Phasengrenze ausbilden. Hiernach kann sich eine Entfernung des Restwassers im Lösemittel sowie die Entfernung des Lösemittels selbst anbieten, an die sich wiederum ein Rücklösen des Dihydrochalkons in einem (ggf. anderen) Lösemittel anschließen kann, welches z.B. für eine gegebenenfalls nachfolgende Kristallisation und Trocknung des Produkts geeignet ist. Alternativ oder ergänzend kann eine adsorptive, eine destillative und/oder eine chromatographische Aufreinigung erfolgen.

[0064] Alternativ können zur Isolierung oder Aufreinigung der gebildeten Flavanonglykosid-Dihydrochalkone Verfahren der Trocknung, insbesondere Verfahren der Vakuumbandtrocknung, Sprühtrocknung, Destillation oder Lyophilisation der zellhaltigen oder -freien Fermentationslösung verwendet werden.

[0065] TRANSGENE MIKROORGANISMEN

[0066] Unter einem „transgenen Mikroorganismus“ ist im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein gentechnisch veränderter bzw. modifizierter Mikroorganismus zu verstehen, in den gezielt mittels biotechnologischer Verfahren Nukleinsäure-Abschnitte (siehe Nukleinsäure-Abschnitte (A) und (B) wie hierin beschrieben) bzw. Gene eines anderen Organismus (sog. Transgene) eingeschleust worden sind.

[0067] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung umfasst daher einen transgenen Mikroorganismus, enthaltend

- (i) einen ersten Nukleinsäure-Abschnitt (A) enthaltend ein für eine bakterielle Chalkonisomerase kodierendes Gen, sowie
- (ii) einen zweiten Nukleinsäure-Abschnitt (B), enthaltend ein für eine bakterielle Enoat-Reduktase kodierendes Gen,

wobei der Nukleinsäure-Abschnitt (A)

- (1) eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:1 darstellt, bei der der Nukleinsäure-Abschnitt (A') gemäß SEQ ID NO:3 herausgeschnitten worden ist, oder
- (2) eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 darstellt, bei der der Aminosäuresäure-Abschnitt (A') gemäß SEQ ID NO:4 herausgeschnitten worden ist.

5 **[0068]** Vorzugsweise handelt es sich dabei um einen fakultativ anaeroben Mikroorganismus, bevorzugt um ein Proteobakterium, insbesondere ein Enterobakterium, zum Beispiel der Gattung *Escherichia*, bevorzugt *E. coli*, insbesondere *E. coli* Rosetta, *E. coli* BL21 *E.coli* K12, *E.coli* MG1655, *E. coli* SE1 und deren Abkömmlinge, Hefen, zum Beispiel *S. cerevisiae* und *P. pastoris*, *K. lactis*, *H. polymorpha* sowie Pilze wie *Aspergillus spp.* oder *Trichoderma spp.*.

10 **[0069]** Der erfindungsgemäße transgene Mikroorganismus zeichnet sich insbesondere dadurch aus, dass

- (i) das für eine bakterielle Chalkonisomerase kodierende Gen für eine Chalkonisomerase aus einem Mikroorganismus aus dem Phylum der Firmicutes kodiert, und/oder
- (ii) das für eine bakterielle Enoat-Reduktase kodierende Gen für eine Enoat-Reduktase aus

15 einem Mikroorganismus aus dem Phylum der Firmicutes kodiert.

[0070] Methoden, um auf Basis der eingeschleusten Nukleinsäure-Abschnitte bzw. der Transgene eine Expression der gewünschten Aminosäuresequenzen bzw. der gewünschten Enzyme zu ermöglichen, sind dem Fachmann ebenfalls hinreichend bekannt, z.B. unter Verwendung eines regulatorischen Elements, insbesondere eines Promotors.

20

[0071] VEKTOR

[0072] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft einen Vektor, d.h. ein Transportvesikel („Genfähre“) zur Übertragung von Fremd-Nukleinsäure(n) in eine Empfängerzelle, insbesondere einen Plasmidvektor, der das Klonieren eines oder mehrerer Nukleinsäure-

25 Abschnitte ermöglicht, enthaltend

- (i) einen ersten Nukleinsäure-Abschnitt (A) enthaltend ein für eine bakterielle Chalkonisomerase kodierendes Gen, sowie
- (ii) einen zweiten Nukleinsäure-Abschnitt (B), enthaltend ein für eine bakterielle Enoat-Reduktase kodierendes Gen,

30 wobei der Nukleinsäure-Abschnitt (A)

- (1) eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:1 darstellt, bei der der Nukleinsäure-Abschnitt (A') gemäß SEQ ID NO:3 herausgeschnitten worden ist, oder
- (2) eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 darstellt, bei der der Aminosäuresäure-Abschnitt (A') gemäß SEQ ID NO:4 herausgeschnitten worden ist.

35

[0073] Ebenfalls umfasst die Erfindung einen Vektor, vorzugsweise einen Plasmidvektor, der sich dadurch auszeichnet, dass er

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

- (ii) einen zweiten Nukleinsäure-Abschnitt (B), enthaltend ein für eine bakterielle Enoat-Reduktase kodierendes Gen

aufweist, wobei der Nukleinsäure-Abschnitt (A)

- (1) eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:1 darstellt, bei der der Nukleinsäure-Abschnitt (A') gemäß SEQ ID NO:3 herausgeschnitten worden ist, oder
- (2) eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 darstellt, bei der der Aminosäure-Abschnitt (A') gemäß SEQ ID NO:4 herausgeschnitten worden ist.

[0074] WIRTSZELLE

[0075] Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine Wirtszelle, enthaltend ein oder mehrere identische oder unterschiedliche erfindungsgemäße Vektoren wie hierin beschrieben. Erfindungsgemäß bevorzugt ist eine Wirtszelle, die sowohl ein oder mehrere Vektoren mit einem Nukleinsäure-Abschnitt (A), enthaltend ein für eine bakterielle Chalkonisomerase kodierendes Gen, als auch ein oder mehrere Vektoren mit einem Nukleinsäure-Abschnitt (B), enthaltend ein für eine bakterielle Enoat-Reduktase kodierendes Gen.

[0076] Bei einer erfindungsgemäßen Wirtszelle handelt es sich vorzugsweise um einen erfindungsgemäß einzusetzenden bzw. einen erfindungsgemäßen Mikroorganismus (wie oben beschrieben). Die hierin beschriebenen erfindungsgemäßen Wirtszellen bzw. erfindungsgemäßen oder erfindungsgemäß einzusetzenden Mikroorganismen sind bzw. dienen vorzugsweise als (Produktions-)Stamm zur biotechnologischen Herstellung hierin beschriebener Dihydrochalkone, insbesondere von Naringin Dihydrochalkon.

[0077] ZUBEREITUNGEN

[0078] Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens kann man so aus ein oder mehreren der oben genannten Flavanonglycoside, die in Flavanonglycosid-haltigen Lebensmitteln oder zur Lebensmittelherstellung geeigneten Zubereitungen enthalten sind, in die entsprechenden Dihydrochalkone umwandelt und damit als natürlich bezeichnbare Zubereitungen erhält, die dadurch charakterisiert sind, dass sie mindestens eines der oben genannten Dihydrochalkone enthält und damit weniger bitter und süßer schmecken als die Ausgangszubereitung.

[0079] Dabei werden die oben definierten Flavanonglycoside bevorzugt aus Pflanzenteilen, insbesondere Früchten oder Fruchtansätzen oder durch übliche Prozesse gewonnene Produkte z.B. getrocknete Früchte oder frische oder getrocknete Fruchtteile (z. B. Albedo, Flavido), Direktsäfte, Saftfraktionen, Nebenströmen der Saftproduktion, etherischen Ölen, Oleoresinen, Saftkonzentraten, Fruchtputees, Presskuchen, frischen oder getrockneten Blättern, der Gattungen *Citrus* oder *Poncirus* oder *Clymenia* oder *Eremocitrus* oder *Microcitrus* oder *Oxanthera* oder *Fortunella* oder *Eriodictyon* oder *Viscum* gefunden. Die oben definierten Flavanonglycoside können aus den durch übliche Prozesse gewonnene Produkten auch durch für die Lebensmittelproduktion erlaubten Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemische oder durch pH-Änderung, bevorzugt alkalischer und dann saurer Behandlung, isoliert, extrahiert oder angereichert werden.

[0080] Die so gewonnenen Flavanonglycosid-haltigen Lebensmittel oder zur Lebensmittelherstellung geeigneten Zubereitungen werden dann mit den erfindungsgemäßen Verfahren

in Dihydrochalkonglycosid-haltige, natürlich bezeichnenbare Zubereitungen umgewandelt und können dann als solche verwendet werden oder nach Entfernung der Wirtszelle und/oder deren Bestandteilen und optionaler Aufkonzentration durch physikalische Prozesse als zur Lebensmittelherstellung geeigneten Zubereitung, bevorzugt als zur Lebensmittelherstellung geeigneten Zubereitung mit bittermaskierender oder süßverstärkender Wirkung eingesetzt werden.

[0081] Beispiele für geeignete Nahrungsmittel umfassen insbesondere Süßwaren (beispielsweise Schokoladen, Schokoladenriegelprodukte, sonstige Riegelprodukte, Fruchtgummi, Hart- und Weichkaramellen, Kaugummi), alkoholische oder nicht-alkoholische Getränke (beispielsweise Kaffee, Tee, Eistee, Wein, weinhaltige Getränke, Bier, bierhaltige Getränke, Liköre, Schnäpse, Weinbrände, (carbonisierte) fruchthaltige Limonaden, (carbonisierte) isotonsche Getränke, (carbonisierte) Erfrischungsgetränke, Nektare, Schorlen, Obst- und Gemüsesäfte, Frucht- oder Gemüsesaftzubereitungen sowie Instantgetränke (beispielsweise Instant-Kakao-Getränke, Instant-Tee-Getränke, Instant-Kaffeegetränke, Instant-Fruchtgetränke).

[0082] Besonders bevorzugt sind dabei als Flavanonglycosid-haltigen Lebensmittel Zitrusssäfte, insbesondere Orangensäfte, die einen hohen Gehalt an Naringin enthalten und durch das erfindungsgemäße Verfahren in erfindungsgemäße Naringindihydrochalkon-haltige Orangensäfte umgewandelt werden können.

[0083] BEISPIELE

[0084] BEISPIEL 1**Klonierungsstrategie**

- 5 **[0085]** Das Herausschneiden der Sequenz des Lids aus dem Gen der CHI wurde mittels der *FastCloning*-Methode durchgeführt. Hierfür erfolgte eine PCR mit den unten genannten Primer auf pET28_CHI (Denaturierung: 30s 95°C, Annealing: 30s 50°C, Elongation: 6.5 min 72°C). Anschließend wurde das Ausgangs-Plasmid mit *DpnI* verdaut.

[0086] Forward Primer: 5'-GATCCCGGCAGCAGCAGAAGGAAATCC-3'

- 10 **[0087]** Reverse Primer: 5'- GGATTTCCTTCTGCTGCTGCCGGGATC-3'

[0088] Nach erfolgreicher Klonierung wurde das Plasmid pET28_CHI_ΔLid (**Abbildung 1**) zusammen mit dem Plasmid pET22_ERED in *E. coli* BL21 transformiert.

[0089] BEISPIEL 2

- 15 **Expression der Doppeltransformation**

[0090] 200 mL LB_{kan,amp} wurden mit 1% (v/v) einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C bis auf eine OD₆₀₀ ≥ 1 angezogen. Dann erfolgte die Induktion der Expression mit 0.1 mM IPTG. Die Expression des Proteins erfolgte 21h bei 20°C.

- 20 **[0091]** Wie in **Abbildung 2** zu sehen ist, erfolgte die Expression der CHI_ΔLid sowohl in der löslichen als auch in der unlöslichen Fraktion, während die ERED nur in der unlöslichen Form exprimierbar ist.

[0092] BEISPIEL 3**Ganz-Zell-Biokatalysen**

- 25 **[0093]** Nach der Ernte der Zellen wurden diese mit 20 mM TRIS-HCl pH 7.5 auf eine OD=150 normiert. Zur Durchführung der Biokatalysen wurden jeweils 490 μL der Zellsuspension mit 10 μL Naringin-Lösung (Stammlösung: 7.5 mM Naringin gelöst in 1,2-Propylenglykol; Endkonzentration: 150 μM) in ein 2-mL-Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und mit Stickstoff begast. Die Biokatalysen wurden bei 23°C, 900 rpm und 22h durchgeführt. Die Extraktion der
- 30 Substrate erfolgte zweimal mit Ethylacetat.

[0094] Nach 22h konnte eine 65%ige Umsetzung des Naringins beobachtet werden (**Abbildung 3**).

[0095] BEISPIEL 4**Entbitterung von Naringin-haltigem Orangensaft**

5 **[0096]** Ein Orangensaft mit einer Konzentration von 100 ppm Naringin wird mit den in Beispiel 3 beschriebenen Zellen inkubiert und bei 23°C unter Rühren 48 h inkubiert. Der Gehalt des Naringins wurde auf 50 ppm gesenkt und gleichzeitig bildet sich Naringindihydrochalkon.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung von Flavanonglykosid-Dihydrochalkonen, umfassend die Schritte:
 - (a) Bereitstellen eines transgenen Mikroorganismus, enthaltend
 - (i) einen ersten Nukleinsäure-Abschnitt (A) enthaltend ein für eine bakterielle Chalkonisomerase kodierendes Gen, sowie
 - (ii) einen zweiten Nukleinsäure-Abschnitt (B), enthaltend ein für eine bakterielle Enoat-Reduktase kodierendes Gen,
 - (b) Hinzufügen eines oder mehrere Flavanonglykoside zu dem transgenen Mikroorganismus,
 - (c) Kultivierung des transgenen Mikroorganismus unter Bedingungen, die die gleichzeitig Isomerisierung und Reduktion des Flavanonglykosids zum Flavanonglykosid-Dihydrochalkon ermöglichen, sowie gegebenenfalls
 - (d) Isolierung und Aufreinigung des Endproduktes.

wobei der Nukleinsäure-Abschnitt (A)

 - (1) eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:1 darstellt, bei der der Nukleinsäure-Abschnitt (A') gemäß SEQ ID NO:3 herausgeschnitten worden ist, oder
 - (2) eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 darstellt, bei der der Aminosäure-Abschnitt (A') gemäß SEQ ID NO:4 herausgeschnitten worden ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass der transgene Mikroorganismus ein fakultativ anaerober Mikroorganismus ist.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und/oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass das für eine bakterielle Chalkonisomerase kodierende Gen für eine Chalkonisomerase aus einem Mikroorganismus aus dem Phylum der Firmicutes kodiert.
4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass das für eine bakterielle Enoat-Reduktase kodierende Gen für eine Enoat-Reduktase aus einem Mikroorganismus aus dem Phylum der Firmicutes kodiert.
5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Nukleinsäure-Abschnitt (B) eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:5 oder SEQ ID NO:7 darstellt.
6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die bakterielle Chalkonisomerase eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:1 enthält, bei der der Nukleinsäure-Abschnitt (A') gemäß SEQ ID NO:3 herausgeschnitten worden ist.
7. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass die bakterielle Enoat-Reduktase eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:5 oder SEQ ID NO:7 enthält.

8. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass der in den transgenen Mikroorganismus exprimierte Aminosäure-Abschnitt (B) eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:6 darstellt.
- 5 9. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass die bakterielle Enoat-Reduktase eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:6 enthält.
10. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Flavanonglycoside ausgewählt sind aus der Gruppe, die gebildet wird Naringin, Narirutin, Prunin (Naringin-7-O-glucosid), Hesperidin, Neohesperidin, Hesperetin-7-O-glucosid, Eriodictyolglycoside wie Eriocitrin, Neoeriodictin, Eriodictyol-7-O-glucosid, Homoeriodictyolglycoside wie Homoeriodictyol-7-O-glucosid, Sterubinglycoside, Sakuranetinglycoside, Isosakuranetinglycoside, 4',7-Dihydroxy-flavanonglycoside, 4',7-Dihydroxy-3'-methoxy-flavanonglycoside, 3',7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavanonglycoside, 3',4',7-Trihydroxy-flavanonglycoside sowie deren Gemischen.
- 15 11. Transgener Mikroorganismus, enthaltend
 - (i) einen ersten Nukleinsäure-Abschnitt (A) enthaltend ein für eine bakterielle Chalkonisomerase kodierendes Gen, sowie
 - (ii) einen zweiten Nukleinsäure-Abschnitt (B), enthaltend ein für eine bakterielle Enoat-Reduktase kodierendes Gen.

20 wobei der Nukleinsäure-Abschnitt (A)

 - (1) eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:1 darstellt, bei der der Nukleinsäure-Abschnitt (A') gemäß SEQ ID NO:3 herausgeschnitten worden ist, oder
 - (2) eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 darstellt, bei der der Aminosäure-Abschnitt (A') gemäß SEQ ID NO:4 herausgeschnitten worden ist.

25
12. Mikroorganismus nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass es sich um einen fakultativ anaeroben Mikroorganismus handelt.
13. Mikroorganismus nach den Ansprüchen 11 und/oder 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass
 - (i) das für eine bakterielle Chalkonisomerase kodierende Gen für eine Chalkonisomerase aus einem Mikroorganismus aus dem Phylum der Firmicutes kodiert, und/oder
 - (ii) das für eine bakterielle Enoat-Reduktase kodierende Gen für eine Enoat-Reduktase aus einem Mikroorganismus aus dem Phylum der Firmicutes kodiert.
14. Vektor, enthaltend
 - (i) einen ersten Nukleinsäure-Abschnitt (A) enthaltend ein für eine bakterielle Chalkonisomerase kodierendes Gen, sowie
 - (ii) einen zweiten Nukleinsäure-Abschnitt (B), enthaltend ein für eine bakterielle Enoat-Reduktase kodierendes Gen.

35 wobei der Nukleinsäure-Abschnitt (A)

- (1) eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:1 darstellt, bei der der Nukleinsäure-Abschnitt (A') gemäß SEQ ID NO:3 herausgeschnitten worden ist, oder
- (2) eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 darstellt, bei der der Aminosäuresäure-Abschnitt (A') gemäß SEQ ID NO:4 herausgeschnitten worden ist.

5 15. Vektor nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass er

- (i) einen ersten Nukleinsäure-Abschnitt (A) enthaltend ein für eine bakterielle Chalkonisomerase kodierendes Gen, sowie
- (ii) einen zweiten Nukleinsäure-Abschnitt (B), enthaltend ein für eine bakterielle Enoat-Reduktase kodierendes Gen

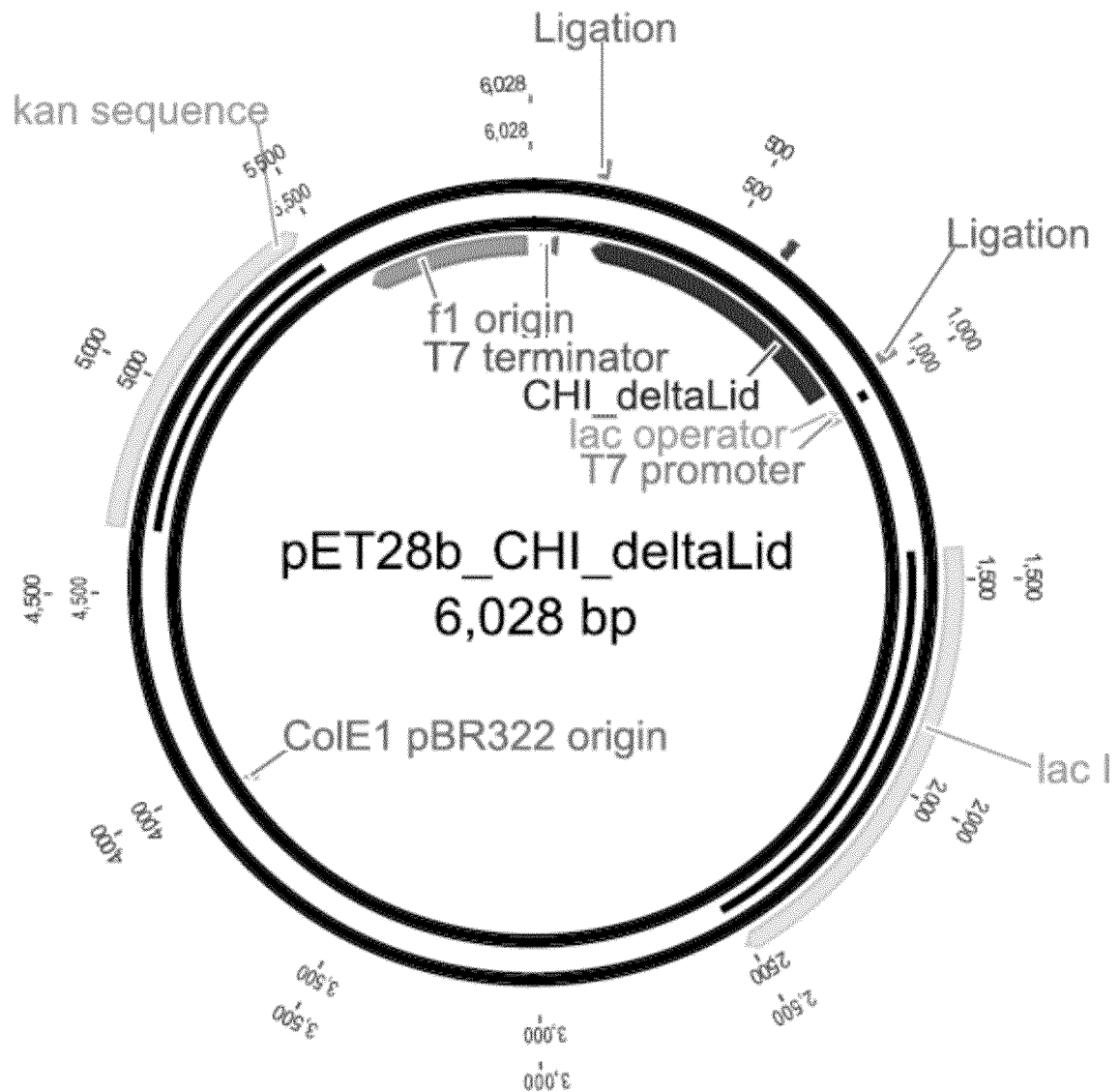
10 aufweist,

wobei der Nukleinsäure-Abschnitt (A)

- (1) eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:1 darstellt, bei der der Nukleinsäure-Abschnitt (A') gemäß SEQ ID NO:3 herausgeschnitten worden ist, oder
- 15 (2) eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 darstellt, bei der der Aminosäuresäure-Abschnitt (A') gemäß SEQ ID NO:4 herausgeschnitten worden ist.

16. Wirtszelle, enthaltend mindestens einen Vektor nach den Ansprüchen 14 und/oder 15.

ABBILDUNGEN

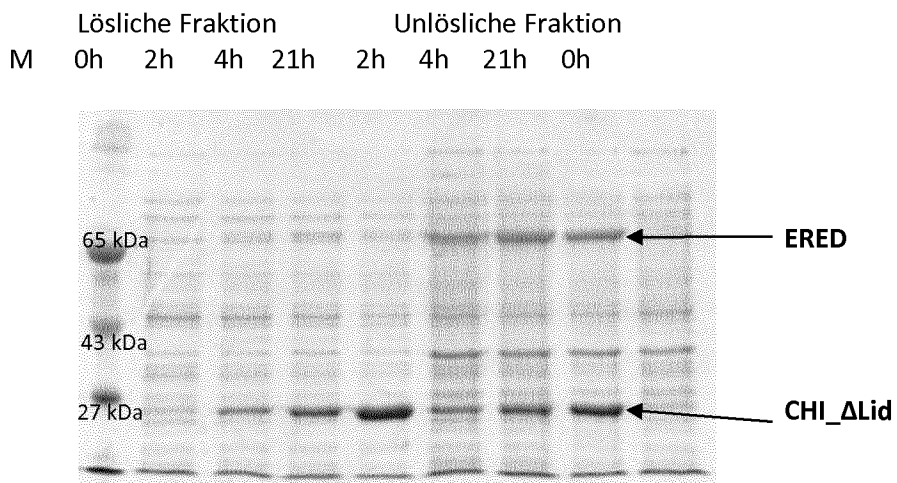


5

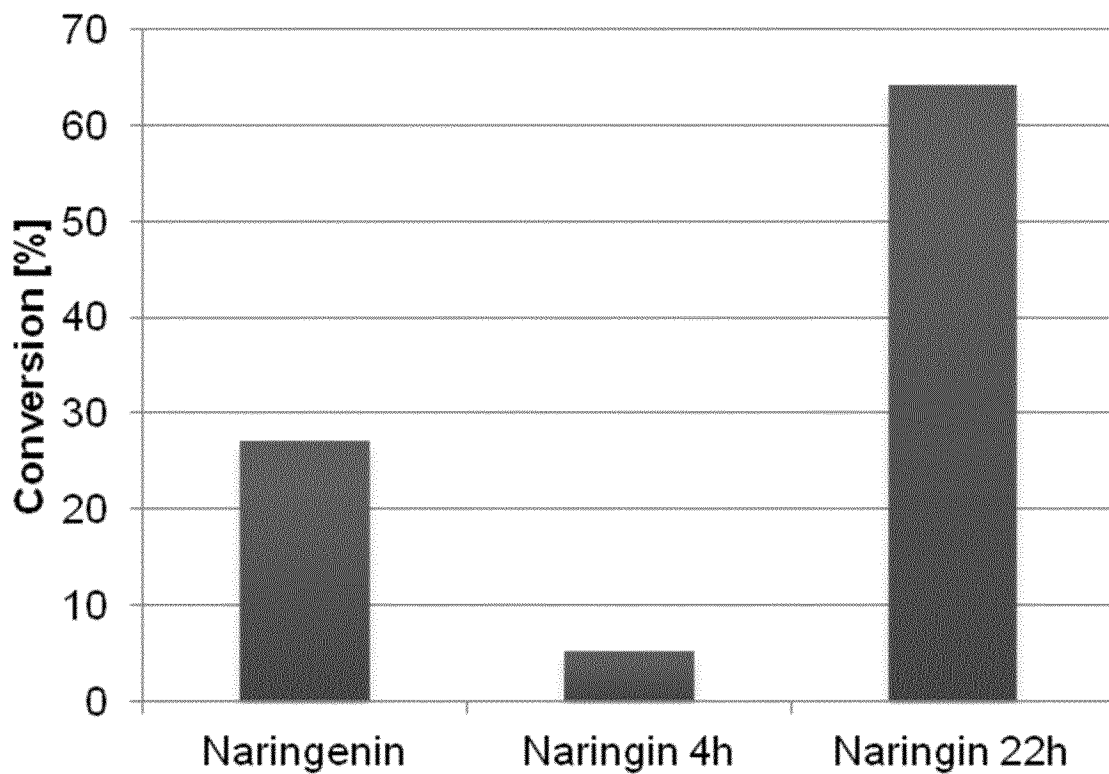
Abbildung 1
Plasmid pET28_CHI_ΔLid.

10

15

**Abbildung 2**

SDS-PAGE der Expression der Doppeltransformation von pET22_ERED und pET28_CHI_ΔLid. 0h kennzeichnet den Zeitpunkt der Induktion.

**Abbildung 3**

Umsetzung der Substrate mittels Ganz-Zell-Biokatalyse.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/064626

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N9/02 C12N9/90 C12P7/26 A23L1/236
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)

C12N C12P A23L

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, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 2 692 729 A1 (SYMRISE AG [DE]) 5 February 2014 (2014-02-05) das ganze Dokument besonders seq id no 4 -----	1-16
Y	MECHTHILD GALL ET AL: "Enzymatische Umsetzung von Flavonoiden mit einer bakteriellen Chalconisomerase und einer Enoatreduktase", ANGEWANDTE CHEMIE (INTERNATIONAL ED. IN ENGLISH), vol. 126, no. 5, 27 January 2014 (2014-01-27), pages 1463-1466, XP055160309, ISSN: 0044-8249, DOI: 10.1002/ange.201306952 the whole document -----	1-16



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

1 October 2015

Date of mailing of the international search report

12/10/2015

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Brück, Marianne

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/064626

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 2692729	A1	05-02-2014	
		CN 103571892 A	12-02-2014
		DE 102012213492 A1	06-02-2014
		EP 2692729 A1	05-02-2014
		US 2014045233 A1	13-02-2014

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2015/064626

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. C12N9/02 C12N9/90 C12P7/26 A23L1/236 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) C12N C12P A23L		
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, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 2 692 729 A1 (SYMRISE AG [DE]) 5. Februar 2014 (2014-02-05) das ganze Dokument besonders seq id no 4 -----	1-16
Y	MECHTHILD GALL ET AL: "Enzymatische Umsetzung von Flavonoiden mit einer bakteriellen Chalconisomerase und einer Enoatreduktase", ANGEWANDTE CHEMIE (INTERNATIONAL ED. IN ENGLISH), Bd. 126, Nr. 5, 27. Januar 2014 (2014-01-27), Seiten 1463-1466, XP055160309, ISSN: 0044-8249, DOI: 10.1002/ange.201306952 das ganze Dokument -----	1-16
☐ 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 1. Oktober 2015		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 12/10/2015
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Brück, Marianne

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2015/064626

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 2692729	A1	05-02-2014	
		CN 103571892 A	12-02-2014
		DE 102012213492 A1	06-02-2014
		EP 2692729 A1	05-02-2014
		US 2014045233 A1	13-02-2014
