

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2011-101643

(P2011-101643A)

(43) 公開日 平成23年5月26日(2011.5.26)

| (51) Int.Cl. | F 1 | テーマコード (参考) |
|-------------------------------|--------------|-----------------|
| C 12 N 1/19 (2006.01) | C 12 N 1/19 | Z N A 4 B 0 2 4 |
| C 12 N 15/09 (2006.01) | C 12 N 1/19 | 4 B 0 6 4 |
| C 12 P 7/42 (2006.01) | C 12 N 15/00 | A 4 B 0 6 5 |
| C 12 P 7/62 (2006.01) | C 12 P 7/42 | |
| C 12 R 1/74 (2006.01) | C 12 P 7/62 | |

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L 外国語出願 (全 29 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|--------------|------------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2010-253092 (P2010-253092) | (71) 出願人 | 501073862 エボニック デグサ ゲーエムベーハー E von i k D e g u s s a G m b H ドイツ連邦共和国 エッセン レーリングハ ウザー シュトラーセ 1-11 R e l l i n g h a u s e r S t r a s s e 1-11, D-45128 Es sen, Germany |
| (22) 出願日 | 平成22年11月11日 (2010.11.11) | (74) 代理人 | 100099483 弁理士 久野 琢也 |
| (31) 優先権主張番号 | 10 2009 046 626.6 | (74) 代理人 | 100061815 弁理士 矢野 敏雄 |
| (32) 優先日 | 平成21年11月11日 (2009.11.11) | (74) 代理人 | 100112793 弁理士 高橋 佳大 |
| (33) 優先権主張国 | ドイツ (DE) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 カンジダトロピカリス細胞及びその使用

(57) 【要約】

【課題】本発明の課題は、十分な量で、特に細胞を取り囲む媒体中で、発酵により - ヒドロキシカルボン酸又は - ヒドロキシカルボン酸エステルを提供するための手段を見出すことであった。

【解決手段】上記課題は、カンジダ トロピカリス細胞、特に株 A T C C 2 0 3 3 6 からのカンジダ トロピカリス細胞であって、その野生型に比較して、以下の A) 、 B) 群を含む 2 つの群から選択されるイントロン不含の核酸配列によりコードされる少なくとも 1 つの酵素の減少した活性を有することを特徴とする細胞、その使用及び - ヒドロキシカルボン酸及び - ヒドロキシカルボン酸エステルの製造方法により解決された。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

A) 配列番号 1 、配列番号 3 、配列番号 5 、配列番号 7 、配列番号 9 、配列番号 11 、配列番号 13 、配列番号 15 、配列番号 17 、配列番号 19 、配列番号 21 、配列番号 23 、配列番号 25 、配列番号 27 、配列番号 29 、配列番号 31 、配列番号 33 、配列番号 35 、配列番号 37 、配列番号 39 、配列番号 41 、配列番号 43 、配列番号 45 、配列番号 47 、配列番号 49 、配列番号 51 、配列番号 53 、配列番号 55 、配列番号 57 、配列番号 59 、配列番号 61 、配列番号 63 、配列番号 65 及び配列番号 67
 B) 配列番号 1 、配列番号 3 、配列番号 5 、配列番号 7 、配列番号 9 、配列番号 11 、配列番号 13 、配列番号 15 、配列番号 17 、配列番号 19 、配列番号 21 、配列番号 23 、配列番号 25 、配列番号 27 、配列番号 29 、配列番号 31 、配列番号 33 、配列番号 35 、配列番号 37 、配列番号 39 、配列番号 41 、配列番号 43 、配列番号 45 、配列番号 47 、配列番号 49 、配列番号 51 、配列番号 53 、配列番号 55 、配列番号 57 、配列番号 59 、配列番号 61 、配列番号 63 、配列番号 65 及び配列番号 67 の配列の1つに対して少なくとも 80 % 同一である配列

からなる 2 つの群 A) 及び B) から選択されるイントロン不含の核酸配列によりコードされる酵素の少なくとも 1 の、野生型に比較して減少した活性を有することを特徴とするカンジダ トロピカリス (*Candida tropicalis*) 細胞。

【請求項 2】

この酵素活性における低下が請求項 1 記載の核酸配列の 1 つを含有する遺伝子の改変により達成され、この改変が、この遺伝子中への外来 DNA の挿入、この遺伝子の少なくとも一部の欠失、この遺伝子配列中の点突然変異、この遺伝子を RNA 干渉の影響下におくこと、及び、この遺伝子部分、特にプロモーター領域の外来 DNA での交換を含む群から選択されていることを特徴とする請求項 1 記載のカンジダ トロピカリス細胞。

【請求項 3】

外来 DNA が選択マーカー遺伝子であることを特徴とする請求項 2 記載のカンジダ トロピカリス細胞。

【請求項 4】

この細胞がその - 酸化において少なくとも部分的に遮断されることを特徴とする請求項 1 から 3 までのいずれか 1 項記載のカンジダ トロピカリス細胞。

【請求項 5】

カンジダ トロピカリス細胞が、カンジダ トロピカリス H 41 、カンジダ トロピカリス H 41 B 、カンジダ トロピカリス H 51 、カンジダ トロピカリス H 45 、カンジダ トロピカリス H 43 、カンジダ トロピカリス H 53 、カンジダ トロピカリス H 534 、カンジダ トロピカリス H 534 B 、カンジダ トロピカリス H 435 、カンジダ トロピカリス ATCC 20962 及びカンジダ トロピカリス HDC 100 を含む群、特にカンジダ トロピカリス ATCC 20962 及びカンジダ トロピカリス HDC 100 からなる群から選択される株に由来することを特徴とする請求項 1 から 4 までのいずれか 1 項記載のカンジダ トロピカリス細胞。

【請求項 6】

- ヒドロキシカルボン酸又は - ヒドロキシカルボン酸エステルの製造のための請求項 1 から 5 までのいずれか 1 項記載の細胞の使用。

【請求項 7】

I) C . トロピカリス (*C. tropicalis*) 細胞を提供する工程、及び
 II) 請求項 1 に記載の核酸配列群 A) 及び B) から選択される配列の 1 つを含有する少なくとも 1 つの遺伝子を、この遺伝子中への外来 DNA 、特に選択マーカー遺伝子をコードする DNA の挿入、この遺伝子の少なくとも一部の欠失、この遺伝子配列中の点突然変異、この遺伝子を RNA 干渉の影響下におくこと、及び、この遺伝子部分、特にプロモーター領域の外来 DNA での交換により、改変する工程

を含む請求項 1 から 5 までのいずれか 1 項記載の C . トロピカリス細胞の製造方法。

10

20

30

40

50

【請求項 8】

- ヒドロキシカルボン酸又は - ヒドロキシカルボン酸エステル、特に - ヒドロキシカルボン酸又は - ヒドロキシカルボン酸エステルであって 6 ~ 24 個の炭素原子のカルボン酸鎖長及び 1 ~ 4 個の炭素原子のエステルのアルコール成分鎖長を有するもの、特に 12 - ヒドロキシドデカノン酸又は 12 - ヒドロキシドデカノン酸メチルエステルの製造方法であって、

a) 請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の細胞と、カルボン酸又はカルボン酸エステルを含有する媒体とを接触させる工程、

b) この細胞がこのカルボン酸又はカルボン酸エステルから相応する - ヒドロキシカルボン酸又は - ヒドロキシカルボン酸エステルを形成できる条件下で細胞を培養する工程、及び

c) 場合により、この形成された - ヒドロキシカルボン酸又は - ヒドロキシカルボン酸エステルを単離する工程を含む製造方法。

【請求項 9】

請求項 5 に記載のその - 酸化において少なくとも部分的に遮断されている細胞を使用することを特徴とする請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

ポリマーの製造のための、請求項 8 又は 9 に記載の方法により得られる - ヒドロキシカルボン酸又は - ヒドロキシカルボン酸エステルの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、遺伝子エンジニアリングされたカンジダ トロピカリス (*Candida tropicalis*) 細胞、その使用及び - ヒドロキシカルボン酸及び - ヒドロキシカルボン酸エステルの製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

アルカン類からジカルボン酸を形成するためのその能力のために、カンジダ トロピカリス (*Candida tropicalis*) は良く特性決定された子囊菌である。

【0003】

WO 91/006660 は、POX4 及び / 又は POX5 遺伝子の中断を介して - 酸化において完全に阻害され、かつ、 - ジカルボン酸の増加した収率を達成するカンジダ トロピカリス細胞を説明する。

【0004】

WO 00/020566 は、カンジダ トロピカリスからのシトクロム P450 モノオキシゲナーゼ及び NADPH シトクロム P450 オキシドレダクターゼ、及び、 - ヒドロキシル化、 - 酸化におけるこの最初の工程に影響を及ぼすためのその使用を説明する。

【0005】

WO 03/089610 は、 - 酸化の第 2 工程、アルデヒドへの脂肪アルコールの変換を触媒作用するカンジダ トロピカリスからの酵素、及び、ジカルボン酸の改善された製造のためのその使用を説明する。

【0006】

これまでの説明されている細胞及び方法は、 - ヒドロキシカルボン酸又はそのエステルの製造のために適さず、というのも、 - ヒドロキシカルボン酸は、短期間生存する中間生成物として常に存在し、かつ、すぐさま更に代謝されるからである。

【0007】

- ヒドロキシカルボン酸及びそのエステルは、ポリマーの前駆体として経済的に重要な化合物であり、かつ、これは本発明の商業的な利用性の基礎を形成する。

【先行技術文献】

10

20

30

40

50

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】WO 91/006660

【特許文献2】WO 00/020566

【特許文献3】WO 03/089610

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の課題は、十分な量で、特に細胞を取り囲む媒体中で、発酵により - ヒドロキシカルボン酸又は - ヒドロキシカルボン酸エステルを提供するための手段を見出すことであった。

【課題を解決するための手段】

【0010】

意外なことに、以下説明する細胞はこの課題の解決に寄与することが見出された。

【0011】

本発明の主題は、したがって、請求項1に記載の細胞である。

【0012】

本発明の他の主題は、本発明の方法による細胞の使用及び本発明による細胞を使用する - ヒドロキシカルボン酸及び - ヒドロキシカルボン酸エステルの製造方法である。

【0013】

本発明の利点は、 - ヒドロキシカルボン酸及びこの相応するエステルへのこの使用する出発材料の穏和な変換、及び、この使用する出発材料に対するこの方法の高い特異性及び関連した高い収率である。

【0014】

本発明の主題の1つは、カンジダ トロピカリス細胞、特に株 ATCC 20336 からのカンジダ トロピカリス細胞であって、その野生型に比較して、以下の A)、B) 群を含む2つの群から選択されるイントロン不含の核酸配列によりコードされる少なくとも1つの酵素の減少した活性を有することを特徴とする細胞である；

A) 配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号41、配列番号43、配列番号45、配列番号47、配列番号49、配列番号51、配列番号53、配列番号55、配列番号57、配列番号59、配列番号61、配列番号63、配列番号65及び配列番号67、特に配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号41、配列番号43、配列番号45、配列番号47、配列番号49及び配列番号51、極めて特に配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、及び配列番号27、

B) 配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号41、配列番号43、配列番号45、配列番号47、配列番号49、配列番号51、配列番号53、配列番号55、配列番号57、配列番号59、配列番号61、配列番号63、配列番号65及び配列番号67、特に配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配

10

20

30

40

50

列番号 3 7 、配列番号 3 9 、配列番号 4 1 、配列番号 4 3 、配列番号 4 5 、配列番号 4 7 、配列番号 4 9 及び配列番号 5 1 、極めて特に配列番号 1 、配列番号 3 、配列番号 5 、配列番号 7 、配列番号 9 、配列番号 1 1 、配列番号 1 3 、配列番号 1 5 、配列番号 1 7 、配列番号 1 9 、配列番号 2 1 、配列番号 2 3 、配列番号 2 5 、及び配列番号 2 7 の配列の 1 つに対して少なくとも 8 0 % 、特に好ましくは少なくとも 9 0 % 、より一層好ましくは少なくとも 9 5 % 、最も好ましくは少なくとも 9 9 % 同一である配列。

【 0 0 1 5 】

この関連において、本発明により好ましい核酸配列群は群 A) である。

【 0 0 1 6 】

細胞の「野生型」は好ましくは、本発明の関連において、本発明による細胞が要素（例えば次のものを含有する遺伝子；相応する酵素をコードする前述の核酸配列又はこの相応する遺伝子中に含有されるプロモーター、これは前述の核酸配列と機能的に連結している）の操作に由来して得られ、前述の核酸配列番号によりコードされる酵素の活性に影響を有する出発株を意味する。例えば、この株 A T C C 2 0 3 3 6 における配列番号 1 によりコードされる酵素の活性が、相応する遺伝子の中止（interruption）により減少している場合には、この変化しておらず、かつ、相応する操作のために使用される株 A T C C 2 0 3 3 6 が「野生型」として考えられるべきである。

10

【 0 0 1 7 】

「遺伝子」との用語は、本発明に関連して、D N A 領域をコードするか又はm R N A に転写されたもの、「構造的遺伝子」だけでなく、さらにプロモーター、可能なイントロン、エンハンサー及び他の調節配列、及びターミネーターの領域を意味する。

20

【 0 0 1 8 】

「酵素の活性」との用語は、常に、本発明に関連して、全体的な細胞により、1 2 - ヒドロキシドデカン酸から 1 , 1 2 - ドデカン二酸への反応を触媒作用する酵素活性を意味する。この活性は好ましくは以下の方法により決定される：

單一コロニーから出発して、Y M 培地（0 . 3 % 酵母エキス、0 . 3 % 麦芽エキス、0 . 5 % ペプトン及び 1 . 0 % (w / w) グルコース）1 0 m l を有する 1 0 0 m l のエルレンマイヤーフラスコを 3 0 度 9 0 r p m で 2 4 時間培養させた。次いで、この培養物から出発して、1 0 m l を製造培地（1 1 につき：2 5 g グルコース、7 . 6 g N H 4 C l 、1 . 5 g N a 2 S O 4 、3 0 0 m l の 1 m M リン酸カリウム緩衝液（p H 7 . 0 ）、2 0 m g Z n S O 4 × 7 H 2 O 、2 0 m g M n S O 4 × 4 H 2 O 、2 0 m g ニコチン酸、2 0 m g ピリドキシン、8 m g チアミン、及び 6 m g パントテナート）1 0 0 m l を有する 1 リットルのエルレンマイヤーフラスコ中へと接種した。これを 2 4 時間 3 0 度培養する。

30

【 0 0 1 9 】

2 4 時間後に、1 2 - ヒドロキシドデカン酸をこの細胞懸濁物に、この濃度が 0 . 5 g / l より大きくなないように添加する。グルコース又はグリセロールもまた補助基質として、この補助基質の濃度が 0 . 2 g / l を下回らないように添加する。0 h 、0 . 5 h 、1 h 後、及び次いで 2 4 h の培養時間まで各時間毎に、試料（1 m l ）を 1 2 - ヒドロキシドデカン酸、1 2 - オキソ - ドデカン酸及び 1 , 1 2 - ドデカン二酸及びこの相応するメチルエステルの測定のために取り出し、この細胞カウントをチェックする。各測定後に、このp H を 6 N の N a O H 又は 4 N の H 2 S O 4 を用いて 5 . 0 ~ 6 . 5 の間に維持する。培養の間に、細胞成長を「コロニー形成単位」（C F U ）をチェックすることより確認する。1 2 - ヒドロキシドデカン酸の減少及び 1 , 1 2 - ドデカン二酸又はこの相応するメチルエステルの製造を L C - M S により確認する。このために、培養液 5 0 0 μ l を p H 1 に調整し、次いで同じ体積のジエチルエーテル又はエチルアセタートで抽出し、L C - M S により分析する。

40

【 0 0 2 0 】

脱気機、オートサンプラー及びカラム炉を有する H P 1 1 0 0 H P L C (Agilent Technologies, Waldbronn, ドイツ国) からなる測定システムを、質量選択四重検出器 M S D (Agilent Technologies, Waldbronn, ドイツ国) に連結する。クロマトグラフィによ

50

る分離を、逆相の、例えば $125 \times 2\text{ mm}$ の Luna C18(2)カラム (Phenomenex, Aschaffenburg, ドイツ国) で 40¹⁰ で達成する。勾配溶出を 0.3 ml / 分の流れで実施する (A : 水中の 0.02% ギ酸、B : アセトニトリル中の 0.02% ギ酸)。又は、この有機抽出物を GC-FID により分析する (Perkin Elmer, Rodgau-Juegesheim, ドイツ国)。クロマトグラフィによる分離をメチルポリシロキサン (5% フェニル) 相で、例えば Elite 5 で、30 m、0.25 mm I.D.、0.25 μm F.D. (Perkin Elmer, Rodgau-Juegesheim, ドイツ国) で行う。測定前に、メチル化試薬、例えばトリメチルスルホニウムヒドロキシド「TMSH」(Macherey-Nagel GmbH&Co. KG, Dueren, ドイツ国) を遊離酸に添加し、注射してこれらを相応するメチルエステルに変換する。

【0021】

1,12-ドデカン二酸の測定された濃度及びサンプリング時間での細胞数の計算により、1,12-ヒドロキシドデカン酸からの 1,12-ドデカン二酸の比製造速度、及びしたがって上記で定義されたとおりの細胞中の「酵素活性」を決定することが可能である。「野生型に比較して減少した活性」との表現は、野生型活性に対して有利には少なくとも 50%、特に有利には少なくとも 90%、より有利には少なくとも 99.9%、より一層有利には少なくとも 99.99%、最も有利には少なくとも 99.999% 減少した活性を意味する。

【0022】

野生型に比較した本発明による細胞の活性における減少は、可能な限り同じ細胞数 / - 濃度を使用しながらこの活性を測定するための上記の方法により決定され、この細胞は同じ条件、例えば培地、ガス処理 (gassing)、攪拌で成長している。²⁰

【0023】

上述の配列に対する「ヌクレオチド同一性」は公知方法を使用して決定されることができる。一般的に、特殊な要求を考慮してアルゴリズムを用いる特殊なコンピュータープログラムを使用する。同一性の決定のための好ましい方法は、まず、比較すべき配列間の最大の一一致を明らかにする。同一性の決定のためのコンピュータープログラムは、限定はされないものの、次のものを含む GCG ソフトウェアパッケージを含む：

- GAP (Deveroy, J. et al., Nucleic Acid Research 12 (1984), 387頁, Genetics Computer Group University of Wisconsin, Medicine (Wi)、及び

- BLASTP、BLASTN 及び FASTA (Altschul, S. et al., Journal of Molecular Biology 215 (1990), 403-410頁。この BLAST プログラムは、the National Center for Biotechnology Information (NCBI) から、及び他の供給源から得ることができる (BLAST マニュアル, Altschul S. et al., NCBI NLM NIH Bethesda ND 22894; Altschul S. et al., 上述)。³⁰

【0024】

既知の Smith-Waterman アルゴリズムもまたヌクレオチド同一性の決定のために使用されることがある。

【0025】

「ヌクレオチド同一性」の決定のために好ましいパラメーターは、BLASTN プログラム (Altschul, S. et al., Journal of Molecular Biology 215 (1990), 403-410頁) を使用する場合には、次のとおりである：⁴⁰

期待閾値 : 10

ワードサイズ : 28

マッチスコア : 1

ミスマッチスコア : -2

ギャップコスト : リニア。

【0026】

上述のパラメーターは、ヌクレオチド配列比較においてデフォルトパラメーターである。⁵⁰

【0027】

このGAPプログラムもまた上述のパラメーターを用いた使用に適している。

【0028】

上述のアルゴリズム手段による80%の同一性は、本発明との関連において、80%の同一性である。同じことはより高い同一性にも当てはまる。

【0029】

「インtron不含核酸配列によりコードされる」との用語は、ここに記載の配列を用いた配列比較において比較すべき核酸配列から前もって任意のインtronを精製すべきことを明らかにする。

【0030】

全ての記載のパーセンテージ(%)は、他に記載がなければ質量パーセンテージである

。

【0031】

微生物において酵素活性を低下させる方法はこの分野の当業者に知られている。

【0032】

特に、分子生物学における技術がこのために使用されることがある。当業者は改変及びタンパク質発現の減少及びこれに関連する酵素活性における減少に関する指示を、特にカンジダトロピカリスのために、とりわけ特定した遺伝子を中断するために、W091/006660; W003/100013; Picataggio et al. Mol Cell Biol. 1991 Sep; 11(9):4333-9; Rohrer et al. Appl Microbiol Biotechnol. 1992 Feb; 36(5):650-4; Picataggio et al. Biotechnology (N Y). 1992 Aug; 10(8):894-8; Ueda et al. Biochim Biophys Acta. 2003 Mar 17; 1631(2):160-8; Ko et al. Appl Environ Microbiol. 2006 Jun; 72(6):4207-13; Hara et al. Arch Microbiol. 2001 Nov; 176(5):364-9; Kanayama et al. J Bacteriol. 1998 Feb; 180(3):690-8に見出すことができる。

【0033】

本発明により好ましい細胞は、酵素活性における減少が、前述の核酸配列群A)及びB)から選択されている配列の1つを含む少なくとも1つの遺伝子の改変により達成されることを特徴とし、この改変は、この遺伝子中への外来DNAの挿入、この遺伝子の少なくとも一部の欠失、この遺伝子配列中の点突然変異、及びこの遺伝子をRNA干渉の影響下におくこと、又は、この遺伝子部分、特にプロモーター領域の外来DNAでの交換を含む群、有利にはこれらからなる群から選択されている。

【0034】

外来DNAは、この文脈において、この遺伝子に対して(この生物に対してでない)「外来」である任意のDNA配列を意味し、すなわち、この文脈においては、カンジダトロピカリス内因性DNA配列ですら「外来」遺伝子として機能する。

【0035】

この文脈において、遺伝子が選択マーカー遺伝子の挿入により中断されることが好ましく、したがって、この外来DNAは選択マーカー遺伝子であり、この挿入は好ましくは遺伝子座中への相同性組み換えにより実施されている。

【0036】

この文脈において、この選択マーカー遺伝子が更なる機能性でもって拡張されている場合が有利である可能性があり、これは遺伝子からの引き続く除去を再度可能にし、これは例えばCre/loxPシステムを用いて、Flipase認識ターゲット(FRT)を用いて、又は、相同性組み換えにより達成されることがある。

【0037】

本発明により好ましい細胞は、これらがその-酸化において少なくとも部分的に、好ましくは完全に遮断されることを特徴とし、というのも、これにより基質の流出を妨げ、したがってより高い力価が可能になるからである。

【0038】

その-酸化において部分的に遮断されたカンジダトロピカリス細胞の例は、EP0499622において株H41、H41B、H51、H45、H43、H53、H534

10

20

30

40

50

、H 5 3 4 B 及び H 4 3 5 として説明され、ここから本発明による好ましいカンジダ トロピカリス細胞が得られる。

【0039】

- 酸化について遮断された他のカンジダ トロピカリス細胞は、例えば WO 03 / 1 0 0 0 1 3 に説明されている。

【0040】

この文脈において、- 酸化が遺伝子 P O X 2 、 P O X 4 、又は P O X 5 の少なくとも 1 つの誘導された機能障害により引き起こされる細胞が好ましい。

【0041】

したがって、この文脈において、本発明により好ましいカンジダ トロピカリス細胞が 10 、 A T C C 2 0 9 6 2 及びカンジダ トロピカリス H D C 1 0 0 (U S 2 0 0 4 / 0 0 1 4 1 9 8 に説明) を含む群から選択される株に由来することを特徴とする細胞が好ましい。

【0042】

本発明による細胞の、- ヒドロキシカルボン酸又は - ヒドロキシカルボン酸エステルの製造のための使用もまた、本発明が対峙する課題の解決に寄与する。

【0043】

特に、- ヒドロキシカルボン酸又は - ヒドロキシカルボン酸エステルであって 6 ~ 2 4 個、好ましくは 8 ~ 1 8 個、特に好ましくは 1 0 ~ 1 6 個の炭素原子のカルボン酸の鎖長を有し、これが好ましくは線状、飽和かつ非置換であり、かつ、 1 ~ 4 個、特に 1 又は 2 個の炭素原子のエステルのアルコール成分の鎖長を有するものの製造のための本発明による細胞の使用が有利である。この文脈において、- ヒドロキシカルボン酸については 1 2 - ヒドロキシドデカン酸が、- ヒドロキシカルボン酸エステルについては 1 2 - ヒドロキシドデカン酸メチルエステルが好ましい。

【0044】

好ましい使用は本発明により、上述のとおりの本発明による好ましい細胞が使用されることにより特徴付けられる。

【0045】

本発明が対峙する課題を解決するための他の寄与は、以下の工程を含む上述のとおりの本発明による C . トロピカリス細胞の製造方法により為される：

I) C . トロピカリス (C. tropicaiis) 細胞、好ましくは、少なくとも部分的に、好ましくは完全に、その - 酸化が遮断されている細胞を提供する工程、及び
II) 上述の核酸配列群 A) 及び B) から選択されるイントロン不含核酸配列の 1 つを含有する少なくとも 1 つの遺伝子を、この遺伝子中への外来 D N A 、特に選択マーカー遺伝子をコードする D N A の挿入、この遺伝子の少なくとも一部の欠失、この遺伝子配列中の点突然変異、及び、この遺伝子を R N A 干渉の影響下におくこと、又は、この遺伝子部分、特にプロモーター領域の外来 D N A での交換により、改変する工程。

【0046】

本発明が対峙する課題を解決するための別の寄与は、- ヒドロキシカルボン酸又は - ヒドロキシカルボン酸エステル、特に - ヒドロキシカルボン酸又は - ヒドロキシカルボン酸エステルであって 6 ~ 2 4 個、好ましくは 8 ~ 1 8 個、とりわけ好ましくは 1 0 ~ 1 6 個の炭素原子のカルボン酸の鎖長を有し、これが好ましくは線状、飽和かつ非置換であり、かつ、 1 ~ 4 個、特に 1 又は 2 個の炭素原子のエステルのアルコール成分の鎖長を有するもの、とりわけ 1 2 - ヒドロキシドデカノン酸又は 1 2 - ヒドロキシドデカノン酸メチルエステルの製造方法であって、

A) 本発明による前述の細胞と、カルボン酸又はカルボン酸エステル、特にカルボン酸又はカルボン酸エステルであって 6 ~ 2 4 個、好ましくは 8 ~ 1 8 個、とりわけ好ましくは 1 0 ~ 1 6 個の炭素原子のカルボン酸の鎖長を有し、これが好ましくは線状、飽和かつ非置換であり、かつ、 1 ~ 4 個の炭素原子のエステルのアルコール成分の鎖長を有するもの、とりわけドデカノン酸又はドデカノン酸メチルエステルを含有する媒体とを接触させる

10

20

30

40

50

工程、

B) この細胞がこのカルボン酸又はカルボン酸エステルから相応する - ヒドロキシカルボン酸又は - ヒドロキシカルボン酸エステルを形成できる条件下で細胞を培養する工程、及び

C) 場合により、この形成された - ヒドロキシカルボン酸又は - ヒドロキシカルボン酸エステルを単離する工程を含む製造方法。

【0047】

本発明により好ましい方法は、本発明により好ましいものとして上述した細胞を使用する。

【0048】

したがって、例えば以下の工程を含む 12 - ヒドロキシデカン酸又は 12 - ヒドロキシデカン酸メチルエステルの製造方法は、極めて特に好ましい：

A) その - 酸化において少なくとも部分的に遮断された株 A T T C 2 0 3 3 6 のカンジダ トロピカリス細胞であって、その野生型に比較して、前述の核酸配列群 A) 及び B) から選択されたイントロン不含核酸配列によりコードされた少なくとも 1 つの酵素の減少した活性を有する細胞と、ドデカノン酸又はドデカノン酸メチルエステルを含有する媒体とを接触させる工程、

この場合に、この酵素の活性の減少は、前述の核酸配列群 A) 及び B) から選択される核酸配列の 1 つを含む遺伝子の改変により達成され、

この場合に、この改変はこの遺伝子中への選択マーカー遺伝子の挿入からなり、

B) この細胞がこのカルボン酸又はカルボン酸エステルから相応する - ヒドロキシカルボン酸又は - ヒドロキシカルボン酸エステルを形成できる条件下で細胞を培養する工程、及び

C) 場合により、この形成された - ヒドロキシカルボン酸又は - ヒドロキシカルボン酸エステルを単離する工程。

【0049】

カンジダ トロピカリスのための適した培養条件はこの分野の当業者に知られている。特に工程 b) のために適した条件は、カンジダ トロピカリスを用いたジカルボン酸の製造のための生物変換方法からこの分野の当業者に知られているようなものである。

【0050】

これら培養条件は、例えば WO 00 / 017380 及 WO 00 / 015828 に記載されている。

【0051】

形成された - ヒドロキシカルボン酸又は - ヒドロキシカルボン酸エステルの単離方法はこの分野の当業者に知られている。これらは水溶液からの長鎖カルボン酸の単離のための標準的な方法であり、例えば蒸留又は抽出であり、例えば WO 2009 / 077461 にも見出されることがある。

【0052】

本発明による方法により獲得された - ヒドロキシカルボン酸又は - ヒドロキシカルボン酸エステルを、ポリマー、特にポリエステルの製造のために使用することが有利である。更に、ラクトンも、この - ヒドロキシカルボン酸から製造されることができ、かつ、次いで例えば再度ポリエステルの製造のために使用されることができる。

【0053】

他の有利な使用は、ポリマーとしてポリアミドを獲得するために、 - ヒドロキシカルボン酸又は - ヒドロキシカルボン酸エステルを - アミノカルボン酸又は - アミノカルボン酸エステルに変換することである。この - アミノカルボン酸又は - アミノカルボン酸エステルは相応するラクタムに最初に変換されることもでき、これは次いで再度アニオン的に、又は酸性触媒作用によってもポリアミドに変換されることができる。

【0054】

第 1 反応工程において、この - ヒドロキシカルボン酸又は相応するエステルを - 才

10

20

30

40

50

キソ - カルボン酸又はこの相應するエステルに変換し、次いでこのオキソ基のアミン化を、例えは還元的アミン化の過程において実施することが特に極めて好ましい。

【 0 0 5 5 】

この文脈において、12 - ヒドロキシドデカン酸又は12 - ヒドロキシドデカン酸メチルエステルの、ポリマー、特にポリアミド12の製造のための使用が特に好ましい。

【配列表】

2011101643000001.app

フロントページの続き

(51) Int.CI.

F I

テーマコード(参考)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 R 1:74

(74)代理人 100128679

弁理士 星 公弘

(74)代理人 100135633

弁理士 二宮 浩康

(74)代理人 100156812

弁理士 篠 良一

(74)代理人 100114890

弁理士 アインゼル・フェリックス=ラインハルト

(72)発明者 マルクス ペッター

ドイツ連邦共和国 ミュンスター ゲメンヴェーク 45

(72)発明者 ハンス-ゲオルク ヘネマン

ドイツ連邦共和国 ベートブルク ザウアーブルフシュトラーセ 8

(72)発明者 シュテフェン シャファー

ドイツ連邦共和国 ヘアテン アントニウスシュトラーセ 19

(72)発明者 トーマス ハース

ドイツ連邦共和国 ミュンスター バッケンカンプ 9

F ターム(参考) 4B024 AA20 BA07 BA80 CA04 CA05 CA06 CA09 CA10 CA11 DA12

EA04 FA02 FA07 FA10 GA11 GA19 HA08 HA14

4B064 AD30 AD64 AD83 CA06 CA19 CC24 DA20

4B065 AA75X AB01 AC14 BA02 BA25 CA10 CA12 CA60

【外国語明細書】

Title of Invention

Candida tropicalis cells and use thereof

Detailed Explanation of the Invention

The invention relates to genetically engineered *Candida tropicalis* cells, use thereof and a method of production of ω -hydroxycarboxylic acids and ω -hydroxycarboxylic acid esters.

Owing to its ability to form dicarboxylic acids from alkanes, *Candida tropicalis* is a well-characterized ascomycete.

WO91/006660 describes *Candida tropicalis* cells that are completely inhibited in β -oxidation through interruption of the POX4 and/or POX5 genes, and achieve increased yields of α, ω -dicarboxylic acids.

WO00/020566 describes cytochrome P450 monooxygenases and NADPH cytochrome P450 oxidoreductases from *Candida tropicalis* and use thereof for influencing ω -hydroxylation, the first step in ω -oxidation.

WO03/089610 describes enzymes from *Candida tropicalis* which catalyse the second step of ω -oxidation, the conversion of a fatty alcohol to an aldehyde, and use thereof for improved production of dicarboxylic acids.

The cells and methods described so far are not suitable for the production of ω -hydroxycarboxylic acids or their esters, as the ω -hydroxycarboxylic acids are always only present as a short-lived intermediate and are immediately metabolized further.

ω -Hydroxycarboxylic acids and their esters are economically important compounds as precursors of polymers, and this forms the basis of the commercial usability of the present invention.

The task of the invention was to find a way of preparing ω -hydroxycarboxylic acids or ω -hydroxycarboxylic acid esters by fermentation in sufficient amounts, in particular in the medium surrounding the cells.

It was found, surprisingly, that the cells described hereunder make a contribution to solution of this task.

The object of the present invention is therefore a cell as described in claim 1.

Another object of the invention is the use of the cell according to the invention and a method of production of ω -hydroxycarboxylic acids and ω -hydroxycarboxylic acid esters using the cells according to the invention.

Advantages of the invention are the gentle conversion of the educt used to the ω -hydroxycarboxylic acids and corresponding esters and a high specificity of the method and an associated high yield based on the educt used.

One object of the present invention is a *Candida tropicalis* cell, in particular one from the strain ATCC 20336, which is characterized in that the cell has, compared with its wild type, a reduced activity of at least one of the enzymes that are encoded by the intron-free nucleic acid sequences selected from the two group comprising

A) Seq ID No. 1, Seq ID No. 3, Seq ID No. 5, Seq ID No. 7, Seq ID No. 9, Seq ID No. 11, Seq ID No. 13, Seq

ID No. 15, Seq ID No. 17, Seq ID No. 19, Seq ID No. 21, Seq ID No. 23, Seq ID No. 25, Seq ID No. 27, Seq ID No. 29, Seq ID No. 31, Seq ID No. 33, Seq ID No. 35, Seq ID No. 37, Seq ID No. 39, Seq ID No. 41, Seq ID No. 43, Seq ID No. 45, Seq ID No. 47, Seq ID No. 49, Seq ID No. 51, Seq ID No. 53, Seq ID No. 55, Seq ID No. 57, Seq ID No. 59, Seq ID No. 61, Seq ID No. 63, Seq ID No. 65 and Seq ID No. 67; in particular Seq ID No. 1, Seq ID No. 3, Seq ID No. 5, Seq ID No. 7, Seq ID No. 9, Seq ID No. 11, Seq ID No. 13, Seq ID No. 15, Seq ID No. 17, Seq ID No. 19, Seq ID No. 21, Seq ID No. 23, Seq ID No. 25, Seq ID No. 27, Seq ID No. 29, Seq ID No. 31, Seq ID No. 33, Seq ID No. 35, Seq ID No. 37, Seq ID No. 39, Seq ID No. 41, Seq ID No. 43, Seq ID No. 45, Seq ID No. 47, Seq ID No. 49 and Seq ID No. 51; quite especially Seq ID No. 1, Seq ID No. 3, Seq ID No. 5, Seq ID No. 7, Seq ID No. 9, Seq ID No. 11, Seq ID No. 13, Seq ID No. 15, Seq ID No. 17, Seq ID No. 19, Seq ID No. 21, Seq ID No. 23, Seq ID No. 25, Seq ID No. 27 and Seq ID No. 29,

B) a sequence that is identical to at least 80%, especially preferably to at least 90%, even more preferably to at least 95% and most preferably to at least 99% to one of the sequences Seq ID No. 1, Seq ID No. 3, Seq ID No. 5, Seq ID No. 7, Seq ID No. 9, Seq ID No. 11, Seq ID No. 13, Seq ID No. 15, Seq ID No. 17, Seq ID No. 19, Seq ID No. 21, Seq ID No. 23, Seq ID No. 25, Seq ID No. 27, Seq ID No. 29, Seq ID No. 31, Seq ID No. 33, Seq ID No. 35, Seq ID No. 37, Seq ID No. 39, Seq ID No. 41, Seq ID No. 43, Seq ID No. 45, Seq ID No. 47, Seq ID No. 49, Seq ID No. 51, Seq ID No. 53, Seq ID No. 55, Seq ID No. 57, Seq ID No. 59, Seq ID No. 61, Seq ID No. 63, Seq ID No. 65 and Seq ID No. 67; in particular to Seq ID No. 1, Seq ID No. 3, Seq ID No. 5, Seq ID No. 7, Seq ID No. 9, Seq ID No. 11, Seq ID No. 13, Seq ID No. 15, Seq ID No. 17, Seq ID No. 19, Seq ID No. 21, Seq ID No. 23, Seq ID No. 25, Seq ID No. 27, Seq ID No. 29, Seq ID No. 31, Seq ID No. 33, Seq ID No. 35, Seq ID No. 37, Seq ID No. 39, Seq ID No. 41, Seq ID

No. 43, Seq ID No. 45, Seq ID No. 47, Seq ID No. 49 and Seq ID No. 51; quite especially to Seq ID No. 1, Seq ID No. 3, Seq ID No. 5, Seq ID No. 7, Seq ID No. 9, Seq ID No. 11, Seq ID No. 13, Seq ID No. 15, Seq ID No. 17, Seq ID No. 19, Seq ID No. 21, Seq ID No. 23, Seq ID No. 25 and Seq ID No. 27.

In this connection, the nucleic acid sequence group that is preferred according to the invention is group A).

A "wild type" of a cell preferably means, in connection with the present invention, the starting strain from which the cell according to the invention was derived by manipulation of the elements (for example the genes comprising the aforesaid nucleic acid sequences coding for a corresponding enzyme or the promoters contained in the corresponding gene, which are linked functionally with the aforesaid nucleic acid sequences), which influence the activities of the enzymes encoded by the stated nucleic acid Seq ID No. If for example the activity of the enzyme encoded by Seq ID No. 1 in the strain ATCC 20336 is reduced by interruption of the corresponding gene, then the strain ATCC 20336 that is unchanged and was used for the corresponding manipulation is to be regarded as the "wild type".

The term "gene" means, in connection with the present invention, not only the encoding DNA region or that transcribed to mRNA, the "structural gene", but in addition promoter, possible intron, enhancer and other regulatory sequence, and terminator, regions.

The term "activity of an enzyme" always means, in connection with the invention, the enzymatic activity that catalyses the reactions of 12-hydroxydodecanoic acid to 1,12-dodecane diacid by the entire cell. This

activity is preferably determined by the following method:

Starting from a single colony, a 100-ml Erlenmeyer flask with 10 ml of YM medium (0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone and 1.0% (w/w) glucose) is cultivated at 30°C and 90 rpm for 24 h. Then, starting from this culture, 10 ml is inoculated into a 1-litre Erlenmeyer flask with 100 ml of production medium (for 1 litre: 25 g glucose, 7.6 g NH₄Cl, 1.5 g Na₂SO₄, 300 ml of a 1 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 20 mg ZnSO₄ x 7 H₂O, 20 mg MnSO₄ x 4 H₂O, 20 mg nicotinic acid, 20 mg pyridoxine, 8 mg thiamine and 6 mg pantothenate). It is cultivated for 24 h at 30°C.

After 24 h, 12-hydroxydodecanoic acid is added to the cell suspension, so that the concentration is not greater than 0.5 g/l. Glucose or glycerol is also added as co-substrate, so that the concentration of the co-substrate does not drop below 0.2 g/l. After 0h, 0.5 h, 1h, and then hourly up to a cultivation time of 24 h, samples (1 ml) are taken for measurement of 12-hydroxydodecanoic acid, 12-oxo-dodecanoic acid and 1,12-dodecane diacid and the corresponding methyl esters, and for checking the cell count. After each measurement, the pH is kept between 5.0 and 6.5 with 6N NaOH or 4N H₂SO₄. During cultivation, cell growth is verified by checking the "colony forming units" (CFU). The decrease of 12-hydroxydodecanoic acid and the production of 1,12-dodecane diacid or the corresponding methyl esters are verified by LC-MS. For this, 500 µl of culture broth is adjusted to pH 1 and then extracted with the same volume of diethyl ether or ethyl acetate and analysed by LC-MS.

The measuring system consists of an HP1100 HPLC (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) with degasser, autosampler and column furnace, coupled to a mass-selective quadrupole detector MSD (Agilent

Technologies, Waldbronn, Germany). Chromatographic separation is achieved on a reversed phase e.g. 125x2 mm Luna C18(2) column (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) at 40°C. Gradient elution is performed at a flow of 0.3 ml/min (A: 0.02% formic acid in water and B: 0.02% formic acid in acetonitrile). Alternatively, the organic extracts are analysed by GC-FID (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, Germany). Chromatographic separation is performed on a methylpolysiloxane (5% phenyl) phase e.g. Elite 5, 30 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm FD (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, Germany). Before measurement, a methylation reagent e.g. trimethylsulphonium hydroxide "TMSH" (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) is added to free acids and on injection they are converted to the corresponding methyl esters.

By calculating the measured concentration of 1,12-dodecane diacid and the cell number at the time of sampling, it is possible to determine the specific production rate of 1,12-dodecane diacid from 12-hydroxydodecanoic acid and therefore the "activity of an enzyme" in a cell as defined above. The formulation "reduced activity compared with its wild type" means an activity relative to the wild-type activity preferably reduced by at least 50%, especially preferably by at least 90%, more preferably by at least 99.9%, even more preferably by at least 99.99% and most preferably by at least 99.999%.

The decrease in activity of the cell according to the invention compared with its wild type is determined by the method described above for determining activity using cell numbers/concentrations as identical as possible, the cells having been grown under the same conditions, for example medium, gassing, agitation.

"Nucleotide identity" relative to the stated sequences can be determined using known methods. Generally,

special computer programs are used with algorithms taking special requirements into account. Preferred methods for determining identity first produce the greatest agreement between the sequences to be compared. Computer programs for determining identity comprise, but are not restricted to, the GCG software package, including

- GAP (Deveroy, J. et al., Nucleic Acid Research 12 (1984), page 387, Genetics Computer Group University of Wisconsin, Medicine (Wi), and
- BLASTP, BLASTN and FASTA (Altschul, S. et al., Journal of Molecular Biology 215 (1990), pages 403-410. The BLAST program can be obtained from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and from other sources (BLAST Manual, Altschul S. et al., NCBI NLM NIH Bethesda ND 22894; Altschul S. et al., above)).

The known Smith-Waterman algorithm can also be used for determining nucleotide identity.

Preferred parameters for the determination of "nucleotide identity" are, when using the BLASTN program (Altschul, S. et al., Journal of Molecular Biology 215 (1990), pages 403-410):

| | |
|-------------------|--------|
| Expect Threshold: | 10 |
| Word size: | 28 |
| Match score: | 1 |
| Mismatch score: | -2 |
| Gap costs: | linear |

The above parameters are the default parameters in nucleotide sequence comparison.

The GAP program is also suitable for use with the above parameters.

An identity of 80% according to the above algorithm means, in connection with the present invention, 80% identity. The same applies to higher identities.

The term "that are encoded by the intron-free nucleic acid sequences" makes clear that in a sequence comparison with the sequences given here, the nucleic acid sequences to be compared must be purified of any introns beforehand.

All stated percentages (%) are percentages by weight unless stated otherwise.

Methods of lowering enzymatic activities in microorganisms are known by a person skilled in the art.

In particular, techniques in molecular biology can be used for this. A person skilled in the art can find instructions on modification and decrease of protein expression and the associated decrease in enzyme activity especially for *Candida tropicalis*, in particular for interrupting specified genes, in WO91/006660; WO03/100013; Picataggio et al. Mol Cell Biol. 1991 Sep; 11(9):4333-9; Rohrer et al. Appl Microbiol Biotechnol. 1992 Feb; 36(5):650-4; Picataggio et al. Biotechnology (N Y). 1992 Aug; 10(8):894-8; Ueda et al. Biochim Biophys Acta. 2003 Mar 17; 1631(2):160-8; Ko et al. Appl Environ Microbiol. 2006 Jun; 72(6):4207-13; Hara et al. Arch Microbiol. 2001 Nov; 176(5):364-9; Kanayama et al. J Bacteriol. 1998 Feb; 180(3): 690-8.

Cells preferred according to the invention are characterized in that the decrease in enzymatic activity is achieved by modification of at least one gene comprising one of the sequences selected from the previously stated nucleic acid sequence groups A) and B), the modification being selected from the group

comprising, preferably consisting of, insertion of foreign DNA into the gene, deletion at least of parts of the gene, point mutations in the gene sequence and subjecting the gene to the influence of RNA interference or exchange of parts of the gene with foreign DNA, in particular of the promoter region.

Foreign DNA means, in this context, any DNA sequence that is "foreign" to the gene (and not to the organism), i.e. even *Candida tropicalis* endogenous DNA sequences can, in this context, function as "foreign DNA".

In this context, it is in particular preferable for the gene to be interrupted by insertion of a selection marker gene, therefore the foreign DNA is a selection marker gene, the insertion preferably having been effected by homologous recombination into the gene locus.

In this context, it may be advantageous if the selection marker gene is expanded with further functionalities, which in their turn make subsequent removal from the gene possible, this can be achieved for example with a Cre/loxP system, with Flippase Recognition Targets (FRT) or by homologous recombination.

Cells preferred according to the invention are characterized in that they are blocked in their β -oxidation at least partially, preferably completely, as this prevents outflow of substrate and therefore higher titres become possible.

Examples of *Candida tropicalis* cells partially blocked in their β -oxidation are described in EP0499622 as strains H41, H41B, H51, H45, H43, H53, H534, H534B and H435, from which a *Candida tropicalis* cell preferred according to the invention is derived.

Other *Candida tropicalis* cells blocked for β -oxidation are described for example in WO03/100013.

In this context, cells are preferred for which the β -oxidation is caused by an induced malfunction of at least one of the genes POX2, POX4 or POX5.

Therefore, in this context, cells are preferred that are characterized in that a *Candida tropicalis* cell preferred according to the invention is derived from strains selected from the group comprising ATCC 20962 and the *Candida tropicalis* HDC100 described in US2004/0014198.

The use of the cells according to the invention for the production of ω -hydroxycarboxylic acids or ω -hydroxycarboxylic acid esters also contributes to solution of the task facing the invention.

In particular, the use of the cells according to the invention for the production of ω -hydroxycarboxylic acids or ω -hydroxycarboxylic acid esters with a chain length of the carboxylic acid from 6 to 24, preferably 8 to 18 and especially preferably 10 to 16 carbon atoms, which are preferably linear, saturated and unsubstituted, and a chain length of the alcohol component of the ester from 1 to 4, in particular 1 or 2 carbon atoms, is advantageous. In this context, it is preferable for the ω -hydroxycarboxylic acids to be 12-hydroxydodecanoic acid and for the ω -hydroxycarboxylic acid ester to be 12-hydroxydodecanoic acid methyl ester.

A preferred use is characterized according to the invention in that preferred cells according to the invention as described above are used.

Another contribution to solving the task facing the invention is made by a method of production of the C.

tropicalis cell according to the invention described above comprising the steps:

I) Preparation of a *C. tropicalis* cell, preferably a cell that is blocked in its β -oxidation at least partially, preferably completely

II) Modification of at least one gene comprising one of the intron-free nucleic acid sequences selected from the previously stated nucleic acid sequence groups A) and B) by insertion of foreign DNA, in particular of DNA coding for a selection marker gene, into the gene, deletion of at least parts of the gene, point mutations in the gene sequence and subjecting the gene to the influence of RNA interference or exchange of parts of the gene with foreign DNA, in particular of the promoter region.

Another contribution to solving the task facing the invention is made by a method of production of ω -hydroxycarboxylic acids or ω -hydroxycarboxylic acid esters, in particular of ω -hydroxycarboxylic acids or ω -hydroxycarboxylic acid esters with a chain length of the carboxylic acid from 6 to 24, preferably 8 to 18 and especially preferably 10 to 16 carbon atoms, which are preferably linear, saturated and unsubstituted, and a chain length of the alcohol component of the ester from 1 to 4, in particular of 1 or 2 carbon atoms, in particular of 12-hydroxydodecanoic acid or 12-hydroxydodecanoic acid methyl ester comprising the steps

A) contacting a previously described cell according to the invention with a medium comprising a carboxylic acid or a carboxylic acid ester, in particular a carboxylic acid or a carboxylic acid ester with a chain length of the carboxylic acid from 6 to 24, preferably 8 to 18 and especially preferably 10 to 16 carbon atoms, which are preferably linear, saturated and

unsubstituted, and a chain length of the alcohol component of the ester from 1 to 4 carbon atoms, in particular dodecanoic acid or dodecanoic acid methyl ester,

B) cultivating the cell under conditions that enable the cell to form the corresponding ω -hydroxycarboxylic acid or ω -hydroxycarboxylic acid esters from the carboxylic acid or the carboxylic acid ester and

C) optionally isolating the ω -hydroxycarboxylic acid or ω -hydroxycarboxylic acid esters that formed.

Preferred methods according to the invention use cells stated above as being preferred according to the invention.

Therefore, for example a method of production of 12-hydroxydodecanoic acid or 12-hydroxydodecanoic acid methyl ester comprising the steps

a) contacting a *Candida tropicalis* cell of the strain ATTC 20336 at least partially blocked in its β -oxidation, which has, compared with its wild type, a reduced activity of at least one of the enzymes, which are encoded by the intron-free nucleic acid sequences selected from the previously stated nucleic acid sequence groups A) and B), the decrease in enzymatic activity being achieved by modification of a gene comprising one of the nucleic acid sequences selected from the previously stated nucleic acid sequence groups A) and B),

wherein the modification consists of insertion of a selection marker gene into the gene,

with a medium comprising dodecanoic acid or dodecanoic acid methyl ester,

b) cultivating the cell under conditions that enable the cell to form the corresponding ω -hydroxycarboxylic

acid or ω -hydroxycarboxylic acid esters from the carboxylic acid or the carboxylic acid ester and

c) optionally isolating the ω -hydroxycarboxylic acid or ω -hydroxycarboxylic acid esters that formed

is quite especially preferred.

Suitable cultivation conditions for *Candida tropicalis* are known by a person skilled in the art. In particular, suitable conditions for step b) are those that are known by a person skilled in the art from bioconversion methods of production of dicarboxylic acids with *Candida tropicalis*.

These cultivation conditions are described for example in WO00/017380 and WO00/015828.

Methods for isolating the ω -hydroxycarboxylic acid or ω -hydroxycarboxylic acid esters that formed are known by a person skilled in the art. These are standard methods for isolating long-chain carboxylic acids from aqueous solution, for example distillation or extraction, and can for example also be found in WO2009/077461.

It is advantageous to use the ω -hydroxycarboxylic acids or ω -hydroxycarboxylic acid esters obtained by the method according to the invention for the production of polymers, in particular polyesters. Moreover, lactones can also be produced from the ω -hydroxy carboxylic acids, and can then for example be used in their turn for the production of polyesters.

Another advantageous use is to convert the ω -hydroxycarboxylic acids or ω -hydroxycarboxylic acid esters to ω -aminocarboxylic acids or ω -aminocarboxylic acid esters, in order to obtain polyamides as polymers. The ω -aminocarboxylic acids or ω -aminocarboxylic acid

esters can also be converted first to the corresponding lactams, which can then in their turn be converted using anionic, or also acid catalysis to a polyamide.

It is quite especially advantageous, in a first reaction step, to convert the ω -hydroxycarboxylic acids or corresponding esters into the ω -oxo-carboxylic acids or the corresponding esters and then to carry out amination of the oxo-group, e.g. in the course of reductive amination.

In this context, the use of 12-hydroxy dodecanoic acid or 12-hydroxydodecanoic acid methyl ester for the production of polymers, in particular of polyamide 12, is especially preferred.

Claims

1. A *Candida tropicalis* cell, characterized in that the cell has, compared with its wild type, a reduced activity of at least one of the enzymes that are encoded by the intron-free nucleic acid sequences selected from the two groups A) and B) consisting of
 - A) Seq ID No. 1, Seq ID No. 3, Seq ID No. 5, Seq ID No. 7, Seq ID No. 9, Seq ID No. 11, Seq ID No. 13, Seq ID No. 15, Seq ID No. 17, Seq ID No. 19, Seq ID No. 21, Seq ID No. 23, Seq ID No. 25, Seq ID No. 27, Seq ID No. 29, Seq ID No. 31, Seq ID No. 33, Seq ID No. 35, Seq ID No. 37, Seq ID No. 39, Seq ID No. 41, Seq ID No. 43, Seq ID No. 45, Seq ID No. 47, Seq ID No. 49, Seq ID No. 51, Seq ID No. 53, Seq ID No. 55, Seq ID No. 57, Seq ID No. 59, Seq ID No. 61, Seq ID No. 63, Seq ID No. 65 and Seq ID No. 67
 - B) a sequence that is identical to at least 80% to one of the sequences Seq ID No. 1, Seq ID No. 3, Seq ID No. 5, Seq ID No. 7, Seq ID No. 9, Seq ID No. 11, Seq ID No. 13, Seq ID No. 15, Seq ID No. 17, Seq ID No. 19, Seq ID No. 21, Seq ID No. 23, Seq ID No. 25, Seq ID No. 27, Seq ID No. 29, Seq ID No. 31, Seq ID No. 33, Seq ID No. 35, Seq ID No. 37, Seq ID No. 39, Seq ID No. 41, Seq ID No. 43, Seq ID No. 45, Seq ID No. 47, Seq ID No. 49, Seq ID No. 51, Seq ID No. 53, Seq ID No. 55, Seq ID No. 57, Seq ID No. 59, Seq ID No. 61, Seq ID No. 63, Seq ID No. 65 and Seq ID No. 67.
2. A *Candida tropicalis* cell according to claim 1, characterized in that the decrease in enzymatic activity is achieved by modification of a gene comprising one of the nucleic acid sequences stated in claim 1, the modification being selected

from the group comprising insertion of foreign DNA into the gene, deletion of at least parts of the gene, point mutations in the gene sequence, subjecting the gene to the influence of RNA interference and exchange of parts of the gene with foreign DNA, in particular of the promoter region.

3. A *Candida tropicalis* cell according to claim 2, characterized in that the foreign DNA is a selection marker gene.
4. A *Candida tropicalis* cell according to at least one of the preceding claims, characterized in that the cell is blocked at least partially in its β -oxidation.
5. A *Candida tropicalis* cell according to at least one of the preceding claims, characterized in that the *Candida tropicalis* cell is derived from strains selected from the group comprising *Candida tropicalis* H41, *Candida tropicalis* H41B, *Candida tropicalis* H51, *Candida tropicalis* H45, *Candida tropicalis* H43, *Candida tropicalis* H53, *Candida tropicalis* H534, *Candida tropicalis* 534B, *Candida tropicalis* H435, *Candida tropicalis* ATCC20962 and *Candida tropicalis* HDC100, in particular consisting of *Candida tropicalis* ATCC20962 and *Candida tropicalis* HDC100.
6. Use of the cells according to at least one of the preceding claims for the production of ω -hydroxycarboxylic acids or ω -hydroxycarboxylic acid esters.
7. A method of production of a *C. tropicalis* cell according to at least one of claims 1 to 5 comprising the steps:
 - I) preparation of a *C. tropicalis* cell and

- II) modification of at least one gene comprising one of the sequences selected from the nucleic acid sequence groups A) and B) stated in claim 1 by insertion of foreign DNA, in particular of DNA coding for a selection marker gene, into the gene, deletion at least of parts of the gene, point mutations in the gene sequence, subjecting the gene to the influence of RNA interference and exchange of parts of the gene with foreign DNA, in particular of the promoter region.
8. A method of production of ω -hydroxycarboxylic acids or ω -hydroxycarboxylic acid esters, in particular of ω -hydroxycarboxylic acids or ω -hydroxycarboxylic acid esters with a chain length of the carboxylic acid from 6 to 24 carbon atoms and a chain length of the alcohol component of the ester from 1 to 4 carbon atoms, in particular of 12-hydroxydodecanoic acid or 12-hydroxydodecanoic acid methyl ester comprising the steps
- contacting the cell according to at least one of claims 1 to 5 with a medium comprising a carboxylic acid or a carboxylic acid ester,
 - cultivating the cell under conditions that enable the cell to form the corresponding ω -hydroxycarboxylic acid or ω -hydroxycarboxylic acid esters from the carboxylic acid or the carboxylic acid ester and
 - optionally isolating the ω -hydroxycarboxylic acid or ω -hydroxycarboxylic acid esters that formed.
9. A method according to claim 8, characterized in that cells at least partially blocked in their β -oxidation according to claim 5 are used.
10. Use of the ω -hydroxycarboxylic acid or of the ω -hydroxycarboxylic acid ester obtained by the method according to claim 8 or 9 for the production of a polymer.

ABSTRACT

The invention relates to genetically engineered *Candida tropicalis* cells, use thereof and a method of production of ω -hydroxycarboxylic acids and ω -hydroxycarboxylic acid esters.

【配列表】

201101643000002.app