



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2576799 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12P 7/64 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2017.10.09
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2017.04.26
(86)	European Application Nr.	11721794.3
(86)	European Filing Date	2011.05.30
(87)	The European Application's Publication Date	2013.04.10
(30)	Priority	2010.05.31, EP, 10005644
(84)	Designated Contracting States:	AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO RS SE SI SK SM TR
(73)	Proprietor	Universität des Saarlandes, Campus Saarbrücken, 66123 Saarbrücken, DE-Tyskland
(72)	Inventor	WENZEL, Silke, Siemensstr. 24, 66123 Saarbrücken, DE-Tyskland RACHID, Shwan, c/o Badinan SharifLuise-Rinser Str. 6, 90513 Zirndorf, DE-Tyskland GEMPERLEIN, Katja, Rubenheimer Str. 79, 66399 Mandelbachtal, DE-Tyskland MÜLLER, Rolf, Kirkelerstr. 114, 66440 Blieskastel, DE-Tyskland
(74)	Agent or Attorney	KIPA AB, Box 1065, SE-25110 HELSINGBORG, Sverige

(54)	Title	PRODUCTION OF FATTY ACIDS BY HETEROLOGOUS EXPRESSION OF GENE CLUSTERS FROM MYXOBACTERIA
(56)	References Cited:	WO-A2-2010/063451 LEE SU-JIN ET AL: "Eicosapentaenoic acid (EPA) biosynthetic gene cluster of Shewanella oneidensis MR-1: Cloning, heterologous expression, and effects of temperature and glucose on the production of EPA in Escherichia coli", BIOTECHNOLOGY AND BIOPROCESS ENGINEERING, KOREAN SOCIETY FOR BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, SEOUL, KR, vol. 11, no. 6, 1 November 2006 (2006-11-01), pages 510-515, XP008127685, ISSN: 1226-8372 YOSHITAKE ORIKASA ET AL: "Recombinant production of docosaehaenoic acid in a polyketide biosynthesis mode in Escherichia coli", BIOTECHNOLOGY LETTERS, SPRINGER NETHERLANDS LNKD- DOI:10.1007/S10529-006-9168-6, vol. 28, no. 22, 19 September 2006 (2006-09-19), pages 1841-1847, XP019433307, ISSN: 1573-6776 GARCIA RONALD ET AL: "Fatty acid-related phylogeny of myxobacteria as an approach to discover polyunsaturated omega-3/6 Fatty acids", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC; US, vol. 193, no. 8, 1 April 2011 (2011-04-01), pages 1930-1942, XP008139604, ISSN: 0021-9193, DOI: DOI:10.1128/JB.01091-10 [retrieved on 2011-02-11] SCHNEIKER SUSANNE ET AL: "Complete genome sequence of the myxobacterium Sorangium cellulosum", NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US LNKD- DOI:10.1038/NBT1354, vol. 25, no. 11, 1 November 2007 (2007-11-01), pages 1281-1289, XP002502475, ISSN: 1087-0156 [retrieved on 2007-10-28]

Enclosed is a translation of the patent claims in Norwegian. Please note that as per the Norwegian Patents Acts, section 66i the patent will receive protection in Norway only as far as there is agreement between the translation and the language of the application/patent granted at the EPO. In matters concerning the validity of the patent, language of the application/patent granted at the EPO will be used as the basis for the decision. The patent documents published by the EPO are available through Espacenet (<http://worldwide.espacenet.com>) or via the search engine on our website here: <https://search.patentstyret.no/>

Fremstilling av fettsyrer ved heterolog genekspresjon av genkluster fra myxobakterier

5 Patentkrav

1. Fremgangsmåte for fremstilling av polyumettede fettsyrer ved heterolog genekspresjon av enzymer fra biosynteseveien for polyumettede fettsyrer i en produksjonsorganisme, omfattende å dyrke produksjonsorganismen i nærvær av en fermenterbar karbonkilde,

- hvor produksjonsorganismen er genetisk manipulert til å omfatte et første gen, et andre gen og et tredje gen,

- hvor det første gen inneholder et domene I som koder for en enoylreduktase med en aminosyresekvensidentitet på minst 59 % med en aminosyresekvens fra gruppen som inneholder SEKV. ID. nr. 13, SEKV. ID. nr. 44, SEKV. ID. nr. 75, SEKV. ID. nr. 109, SEKV. ID. nr. 133 og/eller SEKV. ID. nr. 149, og

- hvor det andre gen inneholder et domene IIa som koder for en ketosyntase og en malonyl-CoA-transacylase med en aminosyresekvensidentitet på minst 57 % med en aminosyresekvens fra gruppen som inneholder SEKV. ID. nr. 16, SEKV. ID. nr. 47, SEKV. ID. nr. 78 og/eller SEKV. ID. nr. 112, et domene IIb som koder for minst ett acylbærerprotein med en aminosyresekvensidentitet på minst 26 % med en aminosyresekvens fra gruppen som inneholder SEKV. ID. nr. 19, SEKV. ID. nr. 50, SEKV. ID. nr. 81, SEKV. ID. nr. 115 og/eller SEKV. ID. nr. 155, og et domene IIc som koder for en ketoreduktase og en dehydratase med en aminosyresekvensidentitet på minst 47 % med en aminosyresekvens fra gruppen som inneholder SEKV. ID. nr. 22, SEKV. ID. nr. 53, SEKV. ID. nr. 84, SEKV. ID. nr. 118 og/eller SEKV. ID. nr. 158, og

- hvor det tredje gen inneholder et domene IIIa som koder for en ketosyntase og en kjedelengdefaktor med en aminosyresekvensidentitet på minst 46 % med en aminosyresekvens fra gruppen som inneholder SEKV. ID. nr. 25, SEKV. ID. nr. 56, SEKV. ID. nr. 87, SEKV. ID. nr. 121 og/eller SEKV. ID. nr. 161, og et domene IIIb som koder for minst én dehydratase med en aminosyresekvensidentitet på minst 42 % med en aminosyresekvens fra gruppen som inneholder SEKV. ID. nr. 28, SEKV. ID. nr. 59, SEKV. ID. nr. 90, SEKV. ID. nr. 124 og/eller SEKV. ID. nr. 164, og et domene som koder for en acyltransferase (AT), **karakterisert ved at** acyltransferasen som kodes er en acylglyserolfosfat-acyltransferase (AGPAT) med en aminosyresekvensidentitet på minst 50 % med en aminosyresekvens som kodes av domene IV* som inngår i gruppen som omfatter SEKV. ID. nr. 30, SEKV. ID. nr. 61, SEKV. ID. nr. 95, SEKV. ID. nr. 129, SEKV. ID. nr. 135 og/eller SEKV. ID. nr. 169, og aminosyresekvenser som kodes av en nukleinsyresekvensseksjon som

inngår i gruppen som omfatter SEKV. ID. nr. 29, SEKV. ID. nr. 60, SEKV. ID. nr. 94, SEKV. ID. nr. 128, SEKV. ID. nr. 134 og/eller SEKV. ID. nr. 168.

5

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, **karakterisert ved at** domene IV* inngår i en nukleinsyresekvens som koder for Pfa3-genproduktet med en aminosyresekvensidentitet på minst 28 % med en aminosyresekvens som inngår i gruppen som omfatter SEKV. ID. nr. 10 og/eller SEKV. ID. nr. 41, SEKV. ID. nr. 72, SEKV. ID. nr. 106 og/eller SEKV. ID. nr. 146.

10

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, **karakterisert ved at** det tredje genet inneholder et domene IV som koder for en acyltransferase (AT) med en aminosyresekvensidentitet på minst 98 % med en aminosyresekvens fra gruppen som inneholder SEKV. ID. nr. 93, SEKV. ID. nr. 127 og/eller SEKV. ID. nr. 167, hvor domene IV er plassert mellom domene IIIa og domene IIb.

15

4. Fremgangsmåte ifølge et av de foregående krav, **karakterisert ved at** det første genet koder for en enoylreduktase med en aminosyresekvensidentitet på minst 30 % med en aminosyresekvens fra gruppen som inneholder SEKV. ID. nr. 6, SEKV. ID. nr. 37, SEKV. ID. nr. 68, SEKV. ID. nr. 102, SEKV. ID. nr. 132 og/eller SEKV. ID. nr. 142.

20

25

5. Fremgangsmåte ifølge et av de foregående krav, **karakterisert ved at** det andre genet koder for en ketosyntase, en malonyl-CoA-transacylase, et acylbærerprotein, en ketoreduktase og en dehydratase med en aminosyresekvensidentitet på minst 30 % med en aminosyresekvens fra gruppen som inneholder SEKV. ID. nr. 8, SEKV. ID. nr. 39, SEKV. ID. nr. 70, SEKV. ID. nr. 104 og/eller SEKV. ID. nr. 144.

30

6. Fremgangsmåte ifølge et av de foregående krav, **karakterisert ved at** det tredje genet koder for en ketosyntase, en kjedelengdefaktor, en dehydratase og acylglycerolfosfat-acyltransferasen (AGPAT) med en aminosyresekvensidentitet på minst 28 % med en aminosyresekvens fra gruppen som inneholder SEKV. ID. nr. 10, SEKV. ID. nr. 41, SEKV. ID. nr. 72, SEKV. ID. nr. 106 og/eller SEKV. ID. nr. 146.

35

40

7. Fremgangsmåte ifølge et av de foregående krav, **karakterisert ved at** produksjonsorganismen er genetisk manipulert til å kode for protein med en aminosyresekvensidentitet på minst 30 % med en aminosyresekvens som kodes av en DNA-sekvens fra gruppen som består av SEKV. ID. nr. 1, SEKV. ID. nr. 32, SEKV. ID. nr. 63, SEKV. ID. nr. 97, SEKV. ID. nr. 137.

45

8. Fremgangsmåte ifølge et av de foregående krav, **karakterisert ved at** aminosyresekvensidentiteten er minst 60 %, minst 85 %, minst 90 % eller minst 95 %.

5

9. Fremgangsmåte ifølge et av de foregående krav, **karakterisert ved at** den fermenterbare karbonkilden er fri for fettsyrer.

10

10. Fremgangsmåte ifølge et av de foregående krav, **karakterisert ved at** den polyumettede fettsyren omfatter minst 3 etylenisk umettede grupper.

15

11. Fremgangsmåte ifølge et av de foregående krav, **karakterisert ved at** produksjonsorganismen er utvalgt fra gruppen som består av gramnegative eubakterier, grampositive eubakterier, myxobakterier, sopp og gjær.

20

12. Fremgangsmåte ifølge et av de foregående krav, **karakterisert ved at** produksjonsorganismen er utvalgt fra gruppen som består av *Yarrowia lipolytica* eller *Pseudomonas putida*.

25

13. Fremgangsmåte ifølge et av de foregående krav, **karakterisert ved at**
i) en polyumettet fettsyre foreligger i en mengde på minst 40 % (vekt/vekt) basert på totalvekten av alle polyumettede fettsyrer som foreligger i sammensetningen, og/eller
ii) den polyumettede fettsyren er eikosapentaensyre (EPA), dokosaheksaensyre (DHA), linolsyre og/eller linolensyre.

30

14. Anvendelse av en produksjonsorganisme som definert i ethvert av kravene 1 til 13 for fremstilling av polyumettede fettsyrer.

35

15. Anvendelse av et første gen, et andre gen og et tredje gen for konstruksjon av en produksjonsorganisme, hvor

40

- det første gen inneholder et domene I som koder for en enoylreduktase med en aminosyresekvensidentitet på minst 59 % med en aminosyresekvens fra gruppen som inneholder SEKV. ID. nr. 13, SEKV. ID. nr. 44, SEKV. ID. nr. 75, SEKV. ID. nr. 109, SEKV. ID. nr. 133 og/eller SEKV. ID. nr. 149, og

45

- det andre gen inneholder et domene IIa som koder for en ketosyntase og en malonyl-CoA-transacylase med en aminosyresekvensidentitet på minst 57 % med en aminosyresekvens fra gruppen som inneholder SEKV. ID. nr. 16, SEKV. ID. nr. 47, SEKV. ID. nr. 78 og/eller SEKV. ID. nr. 112, et domene IIb som koder for minst ett acylbærerprotein med en

aminosyresekvensidentitet på minst 26 % med en aminosyresekvens fra gruppen som inneholder SEKV. ID. nr. 19, SEKV. ID. nr. 50, SEKV. ID. nr. 81, SEKV. ID. nr. 115 og/eller SEKV. ID. nr. 155, og et domene IIc som koder for en ketoreduktase og en dehydratase med en

5 aminosyresekvensidentitet på minst 47 % med en aminosyresekvens fra gruppen som inneholder SEKV. ID. nr. 22, SEKV. ID. nr. 53, SEKV. ID. nr. 84, SEKV. ID. nr. 118 og/eller SEKV. ID. nr. 158, og

- det tredje gen inneholder et domene IIIa som koder for en ketosyntase og en kjedelengdefaktor med en aminosyresekvensidentitet på minst 46

10 % med en aminosyresekvens fra gruppen som inneholder SEKV. ID. nr. 25, SEKV. ID. nr. 56, SEKV. ID. nr. 87, SEKV. ID. nr. 121 og/eller SEKV. ID. nr. 161, og et domene IIb som koder for minst én dehydratase med en aminosyresekvensidentitet på minst 42 % med en aminosyresekvens fra gruppen som inneholder SEKV. ID. nr. 28, SEKV. ID. nr. 59, SEKV. ID. nr. 90, SEKV. ID. nr. 124 og/eller SEKV. ID. nr. 164, og et domene som koder for en acyltransferase (AT), **karakterisert ved at** acyltransferasen som kodes er en acylglyserolfosfat-

15 acyltransferase (AGPAT) med en aminosyresekvensidentitet på minst 50 % med en aminosyresekvens som kodes av domene IV* som inngår i gruppen som omfatter SEKV. ID. nr. 30, SEKV. ID. nr. 61, SEKV. ID. nr. 95, SEKV. ID. nr. 129, SEKV. ID. nr. 135 og/eller SEKV. ID. nr. 169, og aminosyresekvenser som kodes av en nukleinsyresekvensseksjon som inngår i gruppen som omfatter SEKV. ID. nr. 29, SEKV. ID. nr. 60, SEKV. ID. nr. 94, SEKV. ID. nr. 128, SEKV. ID. nr. 134 og/eller SEKV. ID. nr. 168.

20

25