

Förderschwerpunkt Biotechnologie:

**“Innovatives Verfahren zur Herstellung von Squalen mit Hefe“
(AZ13202-32)**

Projektbeginn: 1.5.2007

Laufzeit: 24 Monate

-Abschlussbericht-

**Dipl. Ing. Andreas Raab
Prof. Dr. Christine Lang
ORGANOBALANCE GmbH
Berlin, August 2009**

Projektkennblatt

der
Deutschen Bundesstiftung Umwelt



Az	13202	Referat	32	Fördersumme	124.916 €
----	--------------	---------	-----------	-------------	------------------

Antragstitel **Umweltfreundliches Verfahren zur Herstellung und Gewinnung von Squalen mittels rekombinanter Hefen als Alternative zur konventionellen Gewinnung hochreinen Squalens aus Haifischleber-Öl**

Stichworte Biokatalyse, Biotechnologie, Expression, Mikrobiologie, Verfahren

Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)
24 Monate	01.05.2007	30.04.2009	1

Förderbereich 4.3 Biotechnologische Verfahren und Produkte

Abschlussbericht 30.04.2009

Bewilligungsempfänger	Prof. Dr. Christine Lang OrganoBalance GmbH Gustav-Meyer Allee 25 13355 Berlin	Tel	030-46307-200
		Fax	030-46307-210
		Projektleitung	Prof. Dr. Detlef Gölling
		Bearbeiter	Andreas Raab

Kooperationspartner

Zielsetzung und Anlaß des Vorhabens

Mit diesem Forschungsvorhaben soll ein Beitrag für die nachhaltige Bereitstellung des chemischen Produkts Squalen geleistet werden. Squalen wird insbesondere in der pharmazeutischen, kosmetischen und chemischen Industrie mit einem Jahresvolumen von derzeit 2000 Tonnen und 125 Mio. USD verwendet. Die Substanz wird als wichtiger Hilfsstoff und biologisch abbaubarer Schmierstoff genutzt. Die biotechnologische Herstellung von Squalen mittels Hefe bietet den großen Vorteil, das bisher überwiegend verwendete Haifisch-Öl für diese Zwecke zu ersetzen. Durch die Umstellung des Herstell-Verfahrens werden zum einen die vom Aussterben bedrohten Haifische geschont und zum anderen kann auf sehr kostenintensive und umweltbelastende Aufreinigungsprozeduren für Squalen verzichtet werden, da die Hefe im Gegensatz zu Fischöl-Produkten keine infektiösen Substanzen oder chlorierte Kohlenwasserstoffe enthält. Das vorliegende Forschungsvorhaben soll es ermöglichen, mit Hefe, Squalen in ökonomisch bedeutsamen Mengen in einem biotechnologischen Verfahren herzustellen.

Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Unter Einsatz von Methoden des "Metabolic Engineering" werden Hefestämme hergestellt, die besonders hohe Mengen an reinem Squalen anreichern. Eine Anreicherung von Squalen wird erreicht, indem das Schrittmacherenzym im Sterol-Biosyntheseweg transkriptionell überexprimiert und dereguliert wird. Um den Reinheitsgrad des angereicherten Squalens zu erhöhen, werden die Gene, welche für die Synthese kontaminierender Lipide, wie Triacylglyceride und Sterylester, verantwortlich sind, deletiert. Die entwickelten Hefestämme werden bezüglich der Parameter Wachstum und Squalenproduktivität, sowie Bildung der nicht erwünschten Triacylglyceride und Sterylester analysiert. Das Lipidspektrum der Lipidpartikeln, sowie der Gesamtlipide der Hefezelle wird quantitativ über densitometrische Analyse von Dünnschichtchromatographien und GC-MS Analyse erfasst. Die grundlegenden Daten zur Entwicklung eines Pilotverfahrens, welches eine Anreicherung von Squalen während des Fermentationsprozesses erlaubt, werden im Schüttelkolben generiert. Auf dieser Grundlage erfolgt dann die weitere Prozessoptimierung im 5 L Fermenter. Schlussendlich wird mittels NMR Analyse untersucht, in welchem Isomerisierungszustand Squalen in der Hefezelle vorliegt.

Ergebnisse und Diskussion

Es wurden Stämme mit einer transkriptionell und auf Proteinebene deregulierten HMG-CoA-Reduktase hergestellt, in welchen zusätzlich die Gene, welche für die Triacylglycerid- und Sterylesterbiosynthese verantwortlich sind (*dga1*, *lro1*, *are1*, *are2*), in verschiedenen Kombinationen deletiert wurden. Die Deletionen führen dazu, daß die unerwünschten, neutralen Lipide nicht mehr gebildet werden. Während im Wildtypstamm AH22ura3 kein Squalen nachweisbar ist, reichert der Stamm AH22ura8tH3 (dereguliertes HMG-Reduktase-Gen) im Schüttelkolben nach 72 Stunden 9,8 % Squalen / BTS an. Die Menge an Squalen / BTS konnte im Stamm AH22ura8tH3are1are2 (zusätzliche Deletion von *are1* und *are2*) auf 11,2% gesteigert werden. Gleichzeitig hat die Deletion der Gene *are1* und *are2* zur Folge, daß keine Sterylester mehr gebildet werden. Die Deletion der Gene *dga1* und *lro1* führt zu einer stark verminderter Squalensynthese und einer Wachstumsstörung. Das überproduzierte Squalen wird in den Lipidpartikeln intrazellulär angereichert. Einige genetische Modifikationen führen zu einem gegenüber dem Wildtyp-Stamm AH22ura3 verbesserten Wachstumsverhalten bezüglich der Zelldichte zum Ende der Fermentation und der Wachstumsrate in der exponentiellen Phase. Die NMR-Analyse des isolierten Hefe-Squalens ergab, daß das von den Hefezellen gebildete Squalen in seiner Struktur mit der Struktur des Squalens aus Haifischleber-Öl übereinstimmt. Squalen wird von den konstruierten Hefestämmen auf fermentierbaren und nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen produziert. Das Konzept der Anreicherung von Squalen in Lipidpartikeln durch Überexpression einer deregulierten HMG-CoA-Reduktase bei gleichzeitiger Ausschaltung der Synthese unerwünschter neutraler Lipide, wie Triacylglyceride und Sterylester, durch Deletion der entsprechenden Synthese-Gene – und damit Erhöhung der Reinheit in der Zusammensetzung der Lipidpartikel konnte umgesetzt werden. Die verfolgten Ziele des Projektes wurden erreicht.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

Im Rahmen des vorliegenden Projektes konnten Hefestämme konstruiert werden, welche sich bezüglich Produktivität, Wachstum und Stabilität für einen industriellen Prozess zur biotechnologischen Herstellung von Squalen eignen. Ein entsprechendes Patent zum Schutz der konstruierten Hefe-Stämme wird beim europäischen Patentamt eingereicht. Die Publikation der Daten zur Stammkonstruktion und zur Prozessetablierung ist in Vorbereitung. Auf der Basis der erarbeiteten Daten konnte ein Kooperationsvertrag zwischen der ORGANOBALANCE GmbH und einem Partner aus der Pharmaindustrie abgeschlossen werden.

Fazit

Es konnten Hefestämme mit einer sehr hohen Squalenproduktivität (bis 11,2 % Squalen bezogen auf die Biotrockenmasse) und gegenüber dem Wildtyp verbesserten Wachstumseigenschaften entwickelt werden. Diese Stämme synthetisieren keine Sterylester mehr, was zu einer erhöhten Produktreinheit führt. Das Konzept der Anreicherung von Squalen in den Lipidpartikeln durch Überexpression einer deregulierten HMG-CoA-Reduktase bei gleichzeitiger Ausschaltung der Synthese unerwünschter neutraler Lipide, wie Sterylester, durch Deletion der entsprechenden Gene konnte umgesetzt werden und hat sich bewährt. Das Squalen aus den Hefe-Stämmen weist dieselbe Isomerie wie Squalen aus Haifischleber-Öl auf. Ein Prozess im Pilot-Maßstab (5 L) konnte etabliert werden.

Inhaltsverzeichnis:

Abbildungsverzeichnis:	- 1 -
Tabellenverzeichnis:	- 1 -
Abkürzungsverzeichnis:	- 2 -
1. Zusammenfassung	- 3 -
2. Anlass und Zielsetzung des Projekts	- 4 -
3. Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden	- 6 -
4. Ergebnisse	- 9 -
4.1. Konstruktion der Deletionsstämme	- 9 -
4.2. Stammevaluierung	- 11 -
4.2.1. Dünnschichtchromatographische Analyse der Gesamtlipide	- 12 -
4.2.2. Zusammensetzung der Lipidpartikel	- 14 -
4.2.3. Squalenproduktivität und Wachstum	- 16 -
4.2.4. Nilrot-Färbung der Zellen: Anfärbung der Lipidpartikel	- 19 -
4.3. Prozessoptimierung	- 20 -
4.4. NMR-Analyse des Squalens aus Hefe	- 24 -
5. Diskussion	- 25 -
6. Öffentlichkeitsarbeit	- 27 -
7. Fazit	- 28 -
8. Literatur	- 29 -

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Biosynthese von Squalen.	- 6 -
Abbildung 2: Biosynthese von Triacylglyceriden	- 7 -
Abbildung 3: Biosynthese von Sterylestern	- 8 -
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Konstruktion der Deletionsstämme.	- 10 -
Abbildung 6: Dünnschichtchromatographie der Gesamtlipidextrakte	- 13 -
Abbildung 7: Densitometrische Analyse nach Dünnschichtchromatographie	- 15 -
Abbildung 8: Densitometrische Analyse nach Dünnschichtchromatographie	- 15 -
Abbildung 9: Nilrot-Färbung	- 19 -
Abbildung 10: Fermentation im 5 L Maßstab	- 21 -
Abbildung 11: Verlauf des pH-Wertes und des Sauerstoffpartialdruckes	- 23 -
Abbildung 12: Overlay 1H-NMR Spektren	- 24 -
Abbildung 13: Strukturvorschlag für die eingeschickte Squalenprobe	- 24 -
Abbildung 14: Zeitplan	- 27 -

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Konstruierte Deletionsstämme	- 10 -
Tabelle 2: Wachstum und Produktivität der angegebenen Stämme	- 16 -
Tabelle 3: Verschiedene Wachstumsparameter der angegebenen Stämme	- 17 -
Tabelle 4: Verschiedene Produktivitätsparameter der angegebenen Stämme.	- 18 -

Abkürzungsverzeichnis:

ADH	Alkohol-Dehydrogenase
BTS	Biotrockensubstanz
CoA	Coenzyme A
EtOH	Ethanol
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
h	Stunde
HMG	Hydroxy-methyl-glutaryl
HPLC	High performance liquid chromatography
l	Liter
m	milli bzw. Meter
NMR	Nuclear magnetic resonance
MS	Massenspektrometrie
OD	optische Dichte
OTC	Over the counter
PCR	Polymerase chain reaction
<i>S. cer.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
STE	Sterylester
t	Tonnen
TAG	Triacylglycerid
tHMG	truncated (verkürzt) Hydroxy-methyl-glutaryl CoA-Reduktase Gen
USD	US-Dollar
UV	Ultraviolett

1. Zusammenfassung

Das beantragte Projektvorhaben betrifft ein Verfahren zur Herstellung und Gewinnung von Squalen mittels rekombinanter Hefen. Ziel ist es, mittels „Metabolic engineering“ einen Hefestamm zu konstruieren, der in der Lage ist, große Mengen an reinem Squalen in speziellen Lipidkompartimenten anzureichern. Der vorliegende Bericht umfasst die Ergebnisse zum Ende der Laufzeit des Projektes im Rahmen der Förderung durch die Deutsche Bundesstiftung Umwelt.

Es wurden Stämme mit einer transkriptionell und auf Proteinebene deregulierten HMG-CoA-Reduktase konstruiert, in welchen die Gene, welche für die Triacylglycerid- und Sterylesterbiosynthese verantwortlich sind (*dgal*, *lrol*, *are1*, *are2*), in verschiedenen Kombinationen deletiert wurden. Die Deletionen führen dazu, daß diese unerwünschten, neutralen Lipide nicht mehr von den entsprechenden Stämmen gebildet werden.

Während im Wildtypstamm AH22*ura3* kein Squalen nachweisbar ist, reichert der Stamm AH22*ura8tH3* im Schüttelkolben nach 72 h in WM8 Medium 9,8 % Squalen / BTS an.

Die Menge an Squalen / BTS konnte im Stamm AH22*ura8tH3are1are2* auf 11,2 % gesteigert werden. Gleichzeitig hat die Deletion der Gene *are1* und *are2* zur Folge, daß keine Sterylester mehr gebildet werden. Nach Deletion des Gene *dgal* und / oder *lrol* (AH22*tH3ura8dgal1rol*) reichern die Zellen nur sehr geringe Mengen Squalen an (2,1 % / BTS).

Das überproduzierte Squalen in den modifizierten Stämmen wird in den Lipidpartikeln angereichert.

Die Deletion der Gene *are1* und / oder *are2* führt nicht zu Wachstumseinschränkungen, sondern zu einem gegenüber dem Wildtyp-Stamm AH22*ura3* verbesserten Wachstumsverhalten bezüglich der Zelldichte zum Ende der Fermentation und der Wachstumsrate in der exponentiellen Phase.

Eine NMR-Analyse ergab, daß das von den Hefezellen gebildete Squalen in seiner Struktur mit der erwünschten Struktur des Squalens aus Haifischleber-Öl übereinstimmt.

Ein Prozess im Pilot-Maßstab (3 l) konnte etabliert werden. Squalen wird von den konstruierten Hefestämmen auf fermentierbaren und nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen produziert. Die Übertragung des Prozesses auf den 100L-Maßstab konnte erfolgreich durchgeführt werden.

Das Konzept der Anreicherung von Squalen in Lipidpartikeln durch Überexpression einer deregulierten HMG-CoA-Reduktase bei gleichzeitiger Ausschaltung der Synthese

unerwünschter neutraler Lipide, wie Triacylglyceride und Sterylester, durch Deletion der entsprechenden Synthese-Gene konnte umgesetzt werden.

Die verfolgten Ziele des Projektes wurden erreicht.

2. Anlass und Zielsetzung des Projekts

Das beantragte Projektvorhaben betrifft ein Verfahren zur Herstellung und Gewinnung von Squalen mittels rekombinanter Hefen. Ziel war es, mittels „Metabolic engineering“ einen Hefestamm zu konstruieren, der in der Lage ist, große Mengen an sehr reinem Squalen in speziellen Lipidkompartimenten zu speichern.

Eine hohe wirtschaftliche Bedeutung dieser Substanz liegt in der Nutzung als Hilfsstoff in der Herstellung von pharmazeutischen Produkten, Nahrungsmitteln, Kosmetika und OTC-Medikationen. Der Jahresumsatz, der zurzeit mit Squalen erzielt wird, liegt bei etwa 125 Mio. USD. Die jährlich industriell genutzte Menge an Squalen liegt bei ca. 2000 t. Squalen kann zudem als biologisch abbaubarer, umweltschonender Schmierstoff in technischen Prozessen verwendet werden, allerdings ist der derzeitige Preis von Squalen (~50 USD / kg) zu hoch für eine solche Anwendung. Eine Reduzierung des Preises auf 10-15 USD / kg würde die Anwendung bereits lukrativ machen. Eine Erweiterung des Einsatzes als biologisch abbaubarer Schmierstoff mit besonderen Eigenschaften würde den Jahresumsatz mit Squalen derzeit auf 1 Mrd. USD steigern lassen.

Squalen wird aufgrund der guten Ausbeute heute standardmäßig aus Fischölen isoliert, bevorzugt aus Haifischleber-Öl. Die Umwelt ist durch den Eingriff in das Ökosystem Meer allerdings stark belastet. Haifische sind eine vom Aussterben bedrohte Tierart. Die Haifisch-Populationen an der Ostküste der USA sind in den vergangenen 15 Jahren dramatisch gesunken. Die Zahl an weißen Haien ist um 79 % gesunken, die Zahl von Hammerhaifischen sogar um 89 %. Für die kanadische Küste werden Zahlen von 99 % publiziert (Baum et al., 2002; Baum und Myers 2003).

Ein technisch großes Problem im Zusammenhang mit der Verwendung von Fischölen im pharmazeutischen und Nahrungsmittel-Umfeld ist die fehlende Reinheit. Fischöle enthalten eine sehr diverse Mischung aus verschiedenen Lipiden und hohe Anteile an Toxinen und Schwermetallen, was eine Anwendung von Haifisch-Squalen im Humanbereich sehr schwierig macht. Daher ist eine aufwendige und umweltbelastende Aufreinigungsprozedur mittels chromatographischer Verfahren und organischer Lösungsmittel notwendig. Ein Verfügbarmachen von hochreinen Produkten ist insbesondere für pharmazeutische

Anwendungen äußerst wichtig. Dabei ist der Reinheitsgrad der Squalen-Quelle von besonderer Bedeutung. In einem weiteren Aspekt ist die Verwendung von Produkten tierischen Ursprungs im pharmazeutischen Bereich zunehmend nicht die bevorzugte Variante. Derzeitige Alternative zu Fischölen ist die Verwendung von synthetischem Squalen auf Rohöl-Basis.

Die Gewinnung von hochreinem Squalen nicht-tierischen Ursprungs aus Mikroorganismen, insbesondere Hefen, stellt eine angestrebte Umwelt- und Ressourcen-schonende Alternative zu Fischölen und Rohöl dar. Squalen ist ein Zwischenprodukt der Ergosterol-Biosynthese in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und kann in großen Mengen intrazellulär in speziellen Fett-Kompartimenten, den sogenannten Lipidpartikeln, angereichert werden.

Um Squalen biotechnologisch ökonomisch konkurrenzfähig herzustellen, ist es notwendig, erstens ausreichende Mengen ($> 10\%$ der Hefetrockenmasse) durch die Mikroorganismen synthetisieren zu lassen und zweitens den Reinheitsgrad des Squalens, welches aus Hefen gewonnen werden soll, zu steigern. Während die Isolation von Lipidpartikeln aus einer Hefezelle vergleichsweise einfach durchzuführen ist, stellt die spezifische Trennung von Squalen und anderen lipidischen Bestandteilen der Lipidpartikel eine große Hürde dar. Auch wenn die Vielfalt an Lipiden in der Hefe gegenüber Fischölen wesentlich geringer ist, finden sich neben Squalen auch andere neutrale Lipide wie Triacylglyceride und Steryl-Acyl-Ester in den Lipidpartikeln. Die Herstellung von Squalen mittels Hefe bringt somit zunächst vergleichbar den Fischölen das Problem der fehlenden Reinheit mit sich und bedarf ebenfalls eines Aufreinigungsprozesses. Dieser Aufreinigungsprozess könnte stark vereinfacht werden bzw. sogar entfallen, wenn die Synthese von Triacylglyceride und Steryl-Acyl-Ester in der Hefe ausgeschaltet ist.

Triacylglyceride und Steryl-Acyl-Ester, welche die Speicherform von langkettigen Fettsäuren und Sterolen darstellen, sind, neben Squalen, die wesentlichen lipidischen Bestandteile der Lipidpartikel in Hefe. Triacylglyceride und Steryl-Acyl-Ester machen den größten Teil der Gesamtlipide einer Hefezelle aus und haben ausschließlich die Funktion der Lipidspeicherung, weshalb sie nicht essentiell sind. Die Stoffwechselwege zur Biosynthese dieser Intermediate sind in Hefe bekannt und charakterisiert. Ließe sich Squalen in Lipidpartikeln anreichern, ohne dass in diesem Zellkompartiment andere neutrale Lipide gespeichert werden, wäre eine Gewinnung von hochreinem Squalen ohne Einsatz von aufwendigen Aufreinigungsprozessen möglich.

3. Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Aufgabe des vorliegenden Forschungsvorhabens ist es, Hefestämme zur Verfügung zu stellen, welche Squalen in Lipidpartikeln in ausreichenden Mengen (mind. 10 % der Hefetrockensubstanz) anreichern, ohne dass gleichzeitig andere lipidische Bestandteile, wie Triglyceride und/oder Sterylester in diesem Kompartiment gespeichert werden.

Eine Anreicherung von Squalen, welches ein Intermediat des Sterol-Biosynthesewegs in Hefe darstellt und natürlicherweise nur in sehr geringen Mengen gebildet wird, wird erreicht, indem die HMG-CoA-Reduktase transkriptionell überexprimiert und dereguliert, sowie der negativen Regulation auf Proteinebene entzogen wird. Die HMG-CoA-Reduktase ist das Schlüsselenzym für die Squalen-Überproduktion, da es als Schrittmacherenzym im Sterol-Biosyntheseweg bekannt ist und den einzigen “Flaschenhals“ im Biosyntheseweg von Acetyl-CoA bis Squalen darstellt (siehe Abbildung 1).

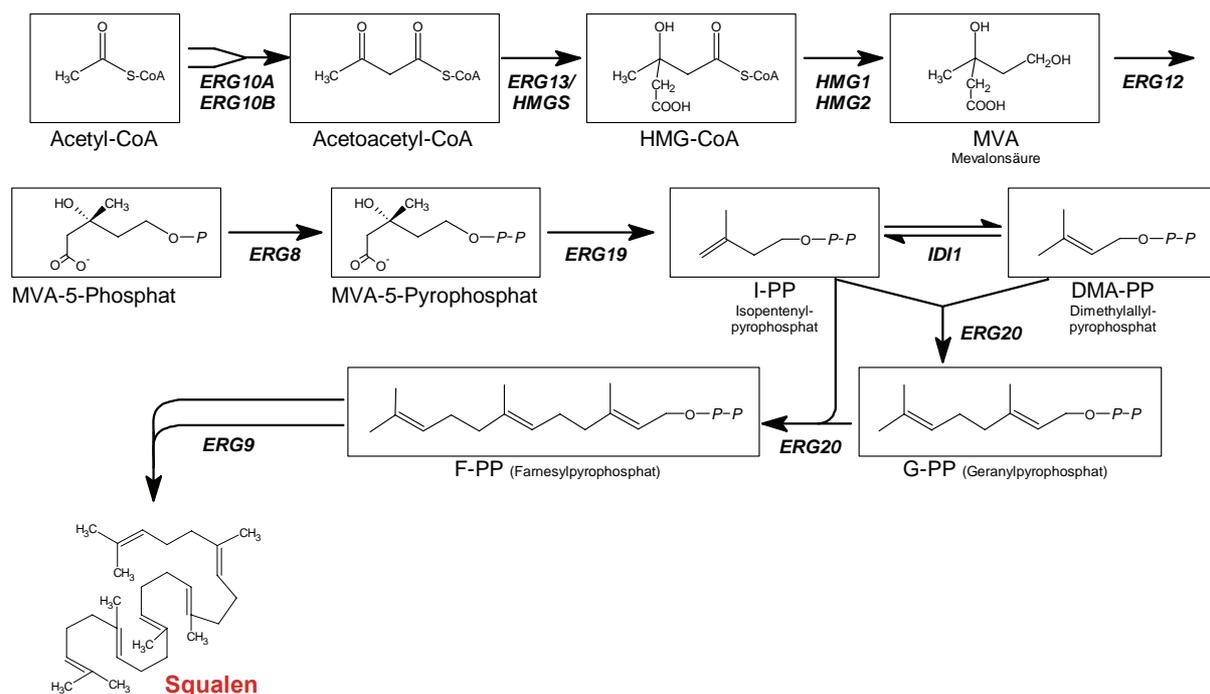


Abbildung 1: Biosynthese von Squalen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (nach Parks et al., 1995).

Es wird eine veränderte Variante des *HMG1* Gens verwendet, welche von dem entsprechenden Gen nur den katalytischen Bereich ohne die membrangebundene Domäne exprimiert (Polakowski et al., 1998). Ziel dieser Veränderung von *HMG1* ist es, die Feedback-Regulation durch Intermediate der Ergosterolbiosynthese zu verhindern. *HMG1* wird zudem der transkriptionellen Regulation entzogen. Dazu wird der Promotor des Gens durch

den "mittleren" *ADHI*-Promotor ersetzt. Dieses Promotorfragment des *ADHI*-Promotors zeigt eine konstitutive Expression (Lang und Looman, 1995; Ruohonen et al., 1995), so dass die transkriptionelle Regulation nicht mehr über Intermediate der Squalen- bzw. Fettsäurebiosynthese abläuft (Lang und Looman, 1995, Veen et al., 2003). Ein solcher Stamm wurde in Vorarbeiten bereits erfolgreich konstruiert (Polakowski et al., 1998, Veen et al., 2003).

Um gleichzeitig den Reinheitsgrad des angereicherten Squalens in der Hefe deutlich zu erhöhen, soll mittels „metabolic engineering“ ein Hefestamm konstruiert werden, welcher in der Lage ist, Squalen als einziges neutrales Lipid in den Lipidpartikeln zu speichern. Die Synthese weiterer kontaminierender neutraler Lipide, nämlich von Triglyceriden und Sterylestern, soll erreicht werden, indem die enzymatischen Reaktionen, welche zur Synthese dieser Lipidkomponenten führen, durch Deletion der entsprechenden Gene unterbunden werden.

Auf diese Weise können Lipidpartikel in der Hefe entstehen, die Squalen in großen Mengen anreichern, ohne andere neutrale lipidische Bestandteile zu speichern. Solche Squalen-reichen Lipidpartikel können durch differenzielle Zentrifugation, Separatoren oder superkritische CO₂-Extraktion abtrennt werden und erlauben somit die Gewinnung von Squalen in sehr reiner Form.

Die Stoffwechselwege zur Biosynthese von Triacylglyceriden (TAG) und Steryl-Acyl-Estern (STE) sind in der Hefe bekannt (Wagner und Daum, 2005). Triacylglyceride entstehen, indem Diacylglyceride (DAG) mit freien Fettsäuren oder Fettsäuren aus Phospholipden verestert werden. An der Biosynthese in der Hefe *S. cerevisiae* sind die Gene *DGAI* (freie Fettsäuren) und *LROI* (Fettsäuren aus Phospholipden) beteiligt (Abbildung 2). Steryl-Acyl-Ester entstehen, indem Sterole mit langkettigen Fettsäuren verestert werden (Yang et al., 1996). Diese Reaktionen werden in der Hefe durch die Steryl-Acyl-Transferasen Are1p (*ARE1*) und Are2p (*ARE2*) katalysiert (Abbildung 3).

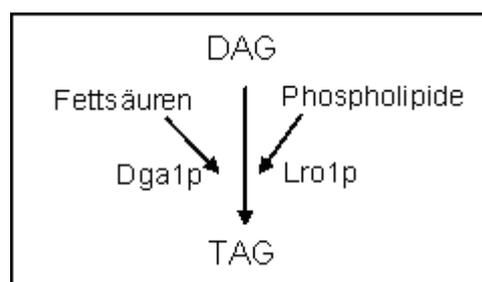


Abbildung 2: Biosynthese von Triacylglyceriden in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

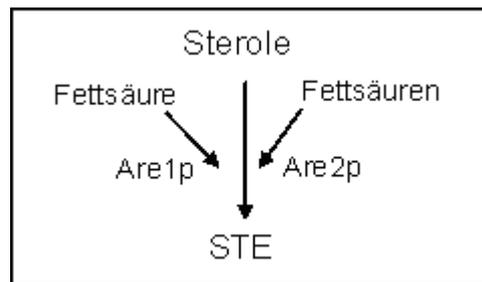


Abbildung 3: Biosynthese von Sterylestern in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Die Entfernung der Gene für die Sterylester- und Triacylglycerolsynthese erfolgt durch gezielte Deletion der Hefegene *ARE1*, *ARE2*, *LRO1* und *DGAI*. Hierfür wird das Cre-Lox-P System verwendet (Guldener et al., 1996). Als Wirt für die Einführung der genetischen Veränderungen dient die Hefe *S. cerevisiae*, insbesondere der Stamm *S. cerevisiae* AH22ura3, der sich in Vorarbeiten als geeigneter Wirt für die Herstellung von Squalen erwiesen hat.

Im Rahmen von Gesprächen, welche ORGANOBALANCE mit potentiellen Kooperationspartnern und Kunden für Squalen-produzierende Hefestämme geführt hat, wurde deutlich, daß eine der hauptsächlichen Hürden bei der Implementierung eines industriellen Prozesses zur biotechnologischen Herstellung von Squalen die Ausbeute nach dem Aufarbeitungsprozess darstellt. Es ist davon auszugehen, daß der Downstream-Prozess mit Extraktion und Aufreinigung zu deutlichen Verlusten des produzierten Squalens führt. Eine ausreichende Produktivität der Hefestämme ist somit für die Umsetzung eines biotechnologischen Prozesses zur Herstellung von Squalen im industriellen Maßstab zwingend erforderlich.

Die während der Stammentwicklung entstehenden veränderten Hefestämme werden bezüglich folgender Parameter charakterisiert: neben dem Wachstum werden vor allem die Squalenproduktivität, sowie die Bildung der nicht erwünschten Triacylglyceride und Sterylester betrachtet. Das Lipidspektrum der Lipidpartikeln, sowie der Gesamtlipide der Hefezelle wird quantitativ über densitometrische Analyse von Dünnschichtchromatographien, sowie mittels GC-MS Analyse erfasst.

Die grundlegenden Daten zur Entwicklung eines Pilotverfahrens, welches eine Anreicherung von Squalen während des Fermentationsprozesses anstrebt, werden zunächst im Schüttelkolben generiert. Auf dieser Grundlage erfolgt dann die weitere Prozessoptimierung

im 5 L Fermenter. Es ist bekannt, dass die Anreicherung von Squalen von verschiedenen Prozessparametern abhängt. Insbesondere der Sauerstoff- und Stickstoffgehalt, sowie bestimmte Nährstofflimitierungen haben großen Einfluss auf die Squalenproduktivität. Ziel ist es, ein Pilotverfahren zur Verfügung zu stellen, welches es ermöglicht, eine industrielle Entwicklung anzuschließen.

Mittels NMR Analyse wird untersucht, in welchem Isomerisierungszustand Squalen in der Hefezelle vorliegt. Hierzu wird eine ausreichende Menge hochreinen Squalens nach Extraktion über HPLC-Fraktionierung gewonnen und zur Analyse an ein Analyselabor eingeschickt.

4. Ergebnisse

4.1. Konstruktion der Deletionsstämme

Im Rahmen des Projektes werden Stämme konstruiert, in welchen die vier Gene, die für die Triacylglycerid- und Sterylester- biosynthese verantwortlich sind (*lro1*, *dga1*, *are1*, *are2*), in allen möglichen Kombinationen deletiert sind. Als Ausgangsstamm für die Einführung der Deletionen dient der Stamm AH22*tH3ura8*. Dieser Stamm exprimiert konstitutiv eine verkürzte, der Feedback-Regulation durch Intermediate der Ergosterolbiosynthese entzogene Version der HMG-CoA-Reduktase und wurde in Vorarbeiten bereits erfolgreich konstruiert (Polakowski et al., 1998, Veen et al., 2003). Das entsprechende verkürzte Gen exprimiert nur den katalytischen Bereich ohne die membrangebundene Domäne des Proteins. Die transkriptionelle Deregulation wurde realisiert, indem der Promotor des Gens durch den "mittleren" *ADHI*-Promotor ersetzt wurde. Dieses Promotorfragment des *ADHI*-Promotors zeigt eine konstitutive Expression (Lang und Looman, 1995; Ruohonen et al., 1995).

Um die oben genannten Gene zu deletieren, werden zunächst Deletionskassetten konstruiert, bestehend aus einem Gen zur Selektion von Integrations-Transformanten (Geneticin-Resistenz-Gen, *kanMX*), flankiert von 40 bp langen Sequenzbereichen, die homolog zum entsprechenden, zu deletierenden Ziellocus (*lro1*, *dga1*, *are1*, *are2*) sind und die zielgerichtete Integration in das Hefegenom ermöglichen.

Nach Amplifikation der gesamten integrativen Genkassette mittels PCR erfolgte eine Hefetransformation, die zur zielgerichteten und basengenauen Integration der gesamten Kassette in das Hefegenom führte, wobei das Gen des entsprechenden Locus deletiert wurde.

Positive Transformanten wurden über das integrierte Gen für die Geneticin Resistenz selektiert.

Abbildung 4 zeigt die molekularbiologische Umsetzung der Konstruktion der Deletionsstämme.

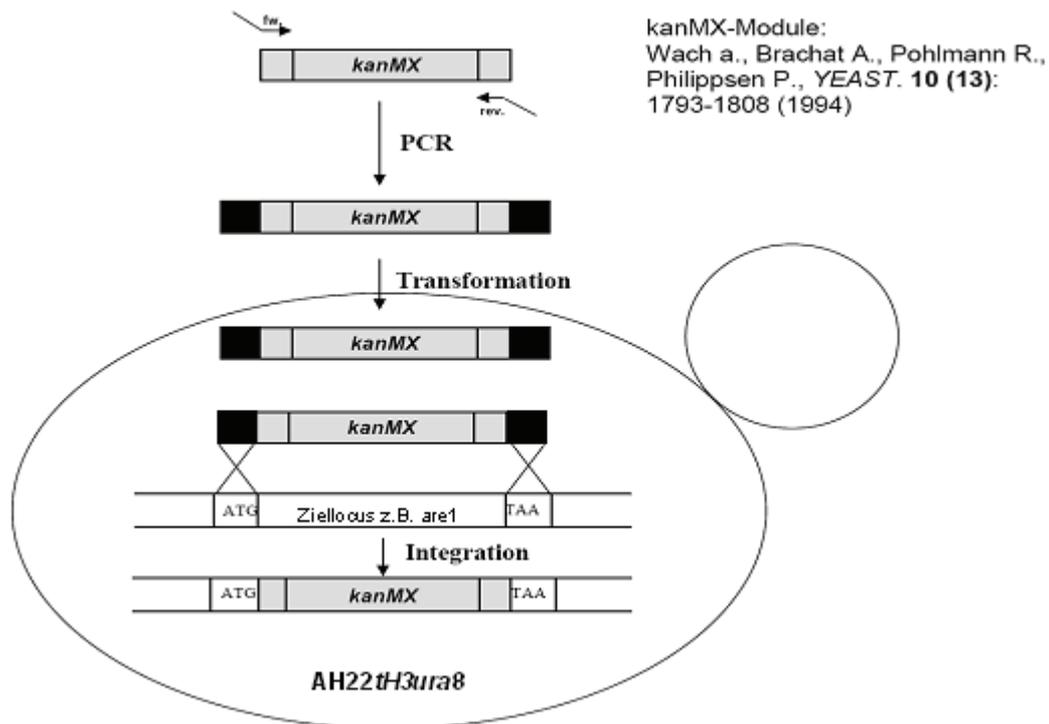


Abbildung 4: Schematische Darstellung der molekularbiologischen Umsetzung der Konstruktion Deletionsstämme.

Die im Rahmen des vorliegenden Projektes konstruierten Deletionsstämme sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Konstruierte Deletionsstämme mit entsprechend veränderten Zielgenen und den dazugehörigen Enzymaktivitäten

Stamm	Zielgen	Enzymaktivität
AH22ura3 (Referenz)	-	-
AH22tH3ura8	<i>HMG1</i> (chromosomale Expression)	HMG-CoA-Reduktase
AH22tH3ura8 <i>are1</i>	<i>are1</i> (Deletion)	Acyl-CoA: Sterol-Acyltransferase
AH22tH3ura8 <i>are2</i>	<i>are2</i> (Deletion)	Acyl-CoA: Sterol-Acyltransferase
AH22tH3ura8 <i>dgal</i>	<i>dag1</i> (Deletion)	Diacylglycerol-Acyltransferase
AH22tH3ura8 <i>lrol</i>	<i>lrol</i> (Deletion)	Diacylglycerol-Acyltransferase
AH22ura3 <i>dgalpFlat1-tHMG</i>	<i>HMG1</i> (episomale Expression)	s.o.
AH22tH3ura8 <i>are1are2</i>	<i>are1are2</i> (Deletion)	s.o.
AH22tH3ura8 <i>dgal1rol</i>	<i>dgal1rol</i> (Deletion)	s.o.

Die chromosomale Expression der deregulierten Version der HMG-CoA-Reduktase wurde mit der episomalen Expression dieses Enzyms bezüglich des Einflusses auf die Squalenproduktion verglichen. Dazu wurden die Stämme AH22*tH3ura8 dgal1* und AH22*ura3 dgal1pFlat1-tHMG* (siehe Tabelle 1) unter gleichen Bedingungen kultiviert und das von den beiden Stämmen angereicherte Squalen per GC-MS bestimmt. Die Analyse ergab, daß AH22*ura3dgal1pFlat1-tHMG* 40 % weniger Squalen anreichert (bezogen auf die BTS), als AH22*tH3ura8 dgal1*.

Deshalb wurden im weiteren Verlauf der Stammentwicklung die Deletionen ausschließlich in Stämmen mit chromosomal integrierter *tHMG* realisiert. Eine chromosomal integrierte Modifikation erhöht die Stammstabilität, was ein wichtiges Kriterium eines Produktionsorganismus ist.

4.2. Stammevaluierung

Sämtliche konstruierten Stämme wurden auf die Parameter Wachstum, Squalenproduktion und Nebenproduktbildung untersucht. Die Messung bzw. Quantifizierung der Squalenproduktion erfolgte über Dünnschicht-Chromatographie und mittels GC-MS Analyse. Die Nebenproduktbildung, vor allem von Triacylglyceriden und Sterylestern, wurde über Dünnschicht-Chromatographie bestimmt, da diese Substanzen nicht unzersetzt verdampfbar sind und sich somit nicht per GC-MS Analyse untersuchen lassen.

Die Kulturführung erfolgte, wenn nicht ausdrücklich anders angegeben, für alle in Kapitel 4.2. beschriebenen Experimente nach dem im Folgenden beschriebenen Kultivierungsschema: Die Vorkultur wurde in 20 ml WMVIII-Medium mit 5 % Saccharose (Lang und Looman, 1995) bei 30°C und 150 rpm (Rundschüttler) in 100 ml Erlenmeyerkolben für 48 h geführt. Die Hauptkultur wurde mit der Vorkultur beimpft (1%) und in 250 ml Schikanekolben in 50 ml WMVIII-Medium auf einem Rundschüttler unter gleichen Bedingungen für 72 h angezogen. Das Auxotrophiemuster des Basisstammes AH22*ura3* erforderte die Supplementierung mit den Aminosäuren Histidin (100mg/L), Leucin (400mg/L) und Uracil (100mg/L).

Für die Hauptkultur wurde eine Kultivierungsdauer von 72 h gewählt, da zu diesem Zeitpunkt davon auszugehen ist, daß sich die Kultur in der stationären Phase befindet. Für die Produktion von Sterolen und deren Vorstufen, wie Squalen, ist dieser Zeitpunkt günstig, da

die Zellen in der stationären Phase weniger Sterole für die Zellwandsynthese benötigen und sich diese Moleküle und deren Vorstufen in den Lipidpartikeln anreichern können.

4.2.1. Dünnschichtchromatographische Analyse der Gesamtlipide

Um den Einfluss der genetischen Modifikationen auf die Gesamtlipidzusammensetzung in den konstruierten Stämmen zu evaluieren, wurden dünnschichtchromatographische Analysen durchgeführt. Eine Einschätzung der Menge der einzelnen Lipide erfolgte somit semiquantitativ. Eine absolute Quantifizierung der Sterylester und Triacylglyceride per GC-MS ist nicht möglich, da diese Lipidkomponenten nicht bzw. nicht unzersetzt verdampfbar sind.

Für die dünnschichtchromatographische Analyse wurde jeweils eine konstante Zellmenge (OD₆₀₀/ml von 30) geerntet, in 200 µl TE Puffer resuspendiert, mit Glasperlen aufgeschlossen und die Gesamtlipide mit 200 µl Chloroform:Methanol (4:1, Vol. %) extrahiert. Die organische Phase wurde abgenommen und jeweils 10 µl auf eine Kieselgel 60 F254 DC-Platte pipettiert. Das Laufmittel setzt sich aus Petrolether:Diethylether:Essigsäure im Verhältnis 90:10:1 (Vol. %) zusammen. Die Lipide auf der DC-Platte wurden mittels Bedampfung mit Jod sichtbar gemacht.

Abbildung 6 zeigt die DC-Analyse der Einfach- und Doppeldeletionsmutanten (Gesamtlipidextrakt), sowie des *tHMG*-Stammes im Vergleich mit dem Wildtyp AH22 $ura3$ als Referenz. Als Standards wurden Ölsäure, Trioleat, Ergosterol, Squalen und Cholesteryloleat appliziert.

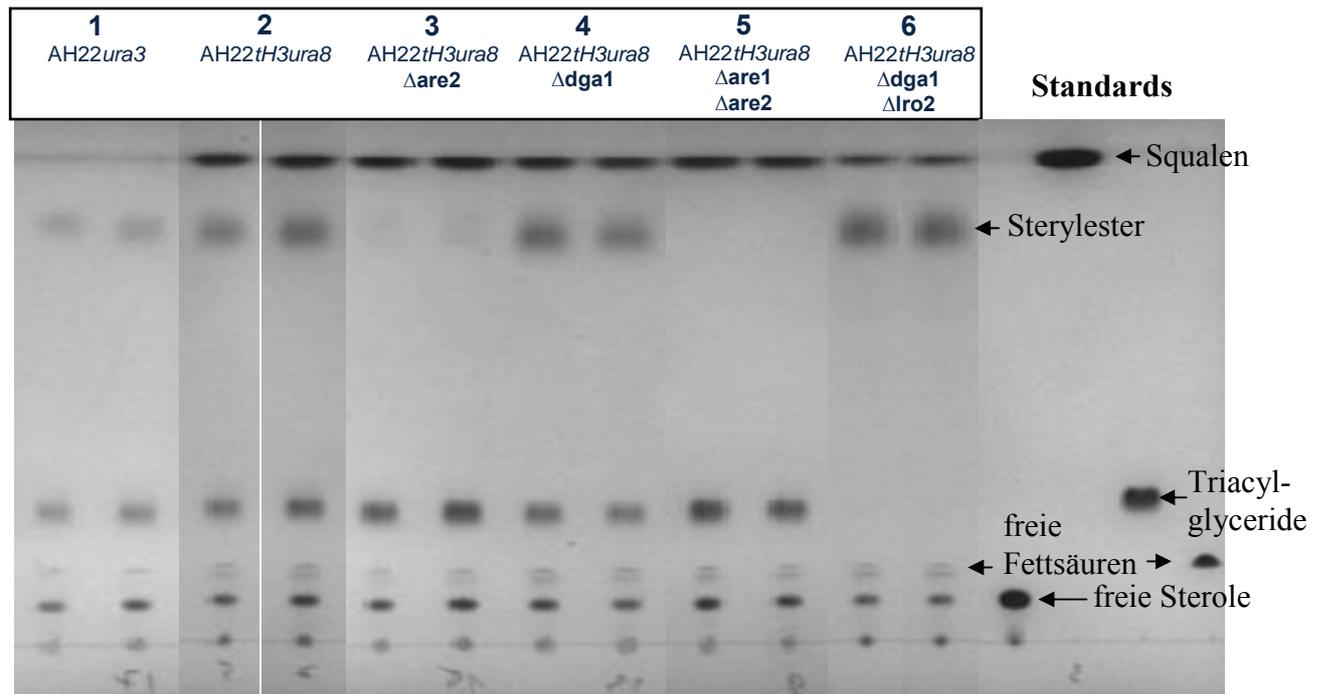


Abbildung 6: Dünnschichtchromatographie eines Gesamtlipidextraktes der oben angegebenen Stämme (Doppelbestimmung) und der Standards Ölsäure, Trioleat, Ergosterol, Squalen und Cholesteryloleat. Es wurden jeweils 10 µl pro Spur aufgetragen. Die Konzentration der Standards betrug 1 mg/ml.

In den beiden Spuren unter 1 (Doppelbestimmung) ist zu sehen, daß der WT-Stamm AH22ura3 kaum Squalen anreichert. Die schwache Bande auf Höhe von Squalen repräsentiert vor allem die Laufmittelfront. Es sind die neutralen Lipide der Lipidpartikel, Triacylglyceride und Sterylester, sowie freie Fettsäuren und Sterole der Plasmamembran zu sehen, also ein Gesamtlipidextrakt einer Wildtyphefe.

Die Spuren unter 2 zeigen neben der Triacylglycerid- und Sterylester- Bande eine ausgeprägte Squalen-Bande. Die Deregulation der HMG-CoA-Reduktase im Stamm AH22tH3ura8 führt also zur Anreicherung von Squalen.

Die Deletion des Gens *are2* führt zu einem stark reduzierten Sterylestergehalt (siehe Spuren unter 3). *ARE2* ist als Hauptenzym für 60 bis 70% der Acyl-CoA: Sterol-Acyltransferase Aktivität verantwortlich (Jensen-Pergakes *et al.*, 2001).

In den beiden Spuren unter 4 ist zu sehen, dass die Deletion des Gens *dgal* zu einer Reduktion des Triacylglyceridgehaltes führt. Die Reduktion scheint hier nicht sehr stark ausgeprägt. *DGAL* ist nur für etwa 25 % der Triacylglyceridsynthese in Hefe verantwortlich (Oelkers *et al.*, 2002). Des Weiteren ist eine leichte Reduktion des Squalengehaltes im *dgal* Deletionsstamm zu beobachten.

Die vier Spuren unter 5 und 6 zeigen, daß die Deletion jeweils beider Gene für die Triacylglycerid- bzw. Sterylester- Synthese zu einem Fehlen dieser beiden

Lipidkomponenten im jeweiligen Hefestamm führen. Das Fehlen der Sterylester scheint keinen Einfluss auf die produzierte Squalenmenge zu haben. Der Stamm *AH22tH3ura8dgal1rol1*, welcher keine Triacylglyceride synthetisiert, reichert dagegen geringere Mengen an Squalen im Vergleich zu *AH22tH3ura8are1are2* an. Die Squalen-Bande in den beiden Spuren unter 6 ist schwächer, als die unter 5. Die Quantifizierung des Squalengehaltes erfolgte per GC-MS Analyse. Die Ergebnisse dieser Analyse sind unter Punkt 4.2.2. aufgeführt.

Die Deletion der Gene *dgal*, *rol1* scheint zu einer Runterregulation der gesamten Lipidbiosynthese zu führen. Bei den hier untersuchten Einfach- und Doppel-Deletionsmutanten ist eine deutliche Reduktion der Lipidbiosynthese, insbesondere von Squalen, im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten. Abb. 6 zeigt, dass insbesondere der Stamm mit Deletionen der für die Triacylglycerid-Biosynthese verantwortlichen Gene (*dgal* und *rol1*) eine stark verminderte Lipidproduktivität aufweist. Möglicherweise ist das Fehlen der Veresterungsreaktion für freie Fettsäuren (zu Triacylglyceriden), welche für die Hefezelle potentiell toxisch sind, die Ursache hierfür. Aufgrund dieser Beobachtung wurde mit den Stämmen, welche Deletionen der für die Sterylester-Biosynthese verantwortlichen Gene (*are1* und *are2*) aufweisen, die Arbeit fortgesetzt und auf die zusätzliche Deletion der Gene *dgal* und *rol1* in diesen Stämmen verzichtet. Die genaue Quantifizierung des Squalengehaltes erfolgte per GC-MS Analyse. Die Ergebnisse dieser Analyse sind unter Punkt 4.2.3. aufgeführt.

4.2.2. Zusammensetzung der Lipidpartikel

Squalen stellt ein Intermediat des Sterolstoffwechsels dar und reichert sich im Wildtyp nicht in signifikanten Mengen in der Zelle an. Die im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Hefestämme reichern Squalen in großen Mengen an. Es sollte geprüft werden, in welchem zellulären Kompartiment das von den modifizierten Stämmen produzierte Squalen akkumuliert. Da die Kapazität der Plasmamembran für die Aufnahme von Squalen begrenzt ist, ist davon auszugehen, daß sich Squalen in den Lipidpartikeln anreichert. Des Weiteren soll die Zusammensetzung der Lipidpartikel untersucht werden.

Dazu wurden die Lipidpartikel der entsprechenden Stämme durch differentielle Ultrazentrifugation nach Leber et al. (1994) isoliert, mit Chloroform:Methanol (4:1, v:v) extrahiert und der Extrakt per Dünnschichtchromatographie analysiert. Eine Quantifizierung erfolgte über densitometrische Auswertung der DC-Platten mit Hilfe von Kalibriergeraden der entsprechenden Standards. Abbildung 7 und 8 zeigt die Ergebnisse dieser Analyse.

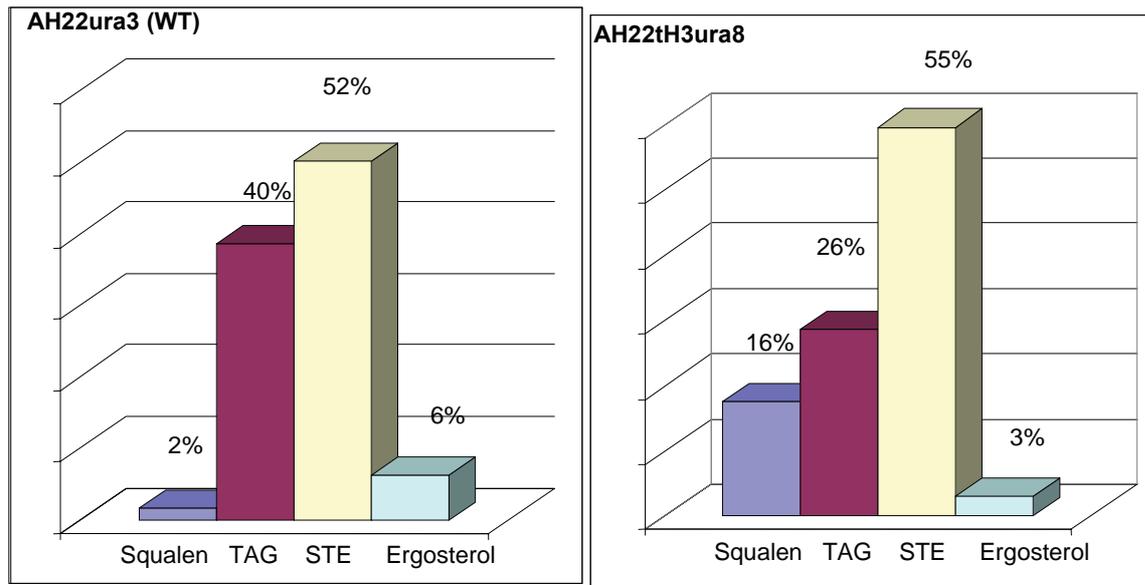


Abbildung 7: Densitometrische Analyse nach Dünnschichtchromatographie eines Extraktes der Lipidpartikel der Stämme AH22ura3 (Wildtyp) und AH22tH3ura8. Dargestellt sind die relativen Gewichtsanteile der Lipidkomponenten Squalen, Ergosterol, Triacylglyceride (TAG) und Sterylester (STE).

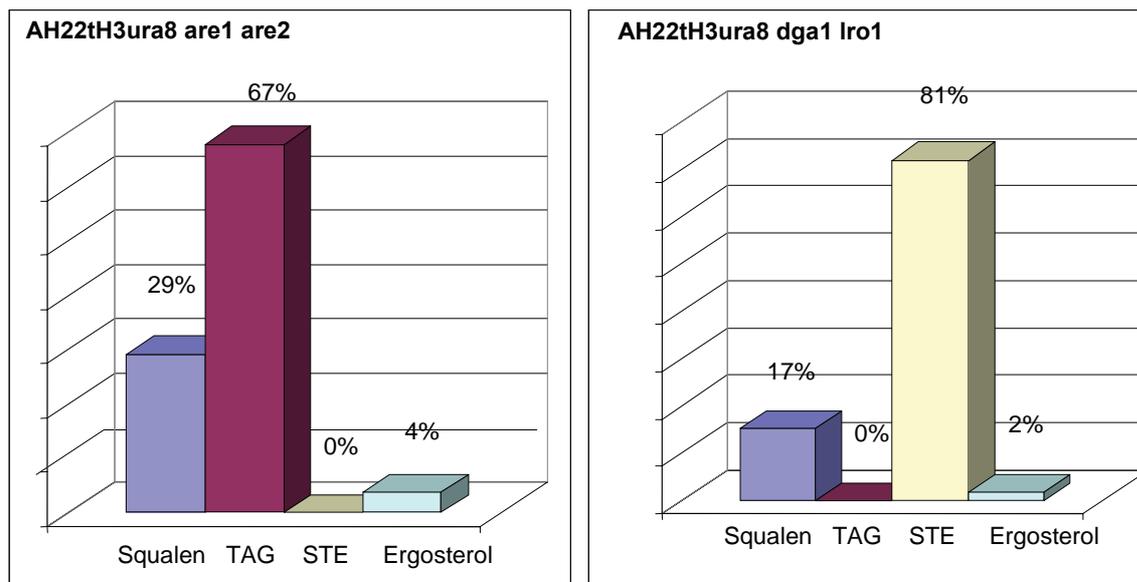


Abbildung 8: Densitometrische Analyse nach Dünnschichtchromatographie eines Extraktes der Lipidpartikel der Stämme AH22tH3ura8are1are2 und AH22tH3ura8dga1lro1. Dargestellt sind die relativen Gewichtsanteile der Lipidkomponenten Squalen, Ergosterol, Triacylglyceride (TAG) und Sterylester (STE).

In Abbildung 7 und 8 ist zu sehen, daß das in den modifizierten Stämmen produzierte Squalen in den Lipidpartikeln akkumuliert. Der Wildtyp (AH22ura3) reichert im Vergleich zu den Stämmen mit transkriptionell und auf Proteinebene deregulierter HMG-CoA-Reduktase nur sehr geringe Mengen an Squalen an. Die Lipidpartikel des Stammes AH22tH3ura8are1are2 bzw. AH22tH3dga1lro1 weisen keine Sterylester bzw. Triacylglyceride auf. Der Anteil des Squalens in den Lipidpartikeln des Stammes AH22tH3dga1lro1 ist geringer als in Stamm AH22tH3ura8are1are2. Diese geringere Squalenproduktivität des Stammes

AH22*tH3dga1lro1* ist konsistent mit den Daten der dünn-schichtchromatographischen Analyse in Abbildung 6.

4.2.3. Squalenproduktivität und Wachstum

Um eine akkurate Quantifizierung der von den verschiedenen Stämmen produzierten Squalenmenge gewährleisten zu können, wurde eine GC-MS Analyse des Gesamtlipidextraktes der in Tabelle 1 aufgeführten Deletionsmutanten und den entsprechenden Kontrollstämmen durchgeführt.

Hierzu wurde eine konstante Zellmenge (OD600/ml von 125) geerntet, in kochendem 0,5 N HCl aufgeschlossen und anschließend wurde mit KOH verseift. Die Lipide wurden in 2 mal 20 ml n-Hexan extrahiert mit MSTFA derivatisiert und analysiert. Durch die Verseifung werden auch die als Sterylester gebundenen Sterole freigesetzt und sind mit den freien Sterolen der Plasmamembran nach Derivatisierung mit MSTFA als TMS-Derivate per GC-MS analysierbar. Die Menge an Squalen wurde über entsprechende Kalibriergeraden bestimmt und auf die eingesetzte Biotrockenmasse bezogen. Squalenverluste während der Aufarbeitung wurden durch Mitführen von internen Standards bestimmt und entsprechend berücksichtigt.

Eine grundsätzliche Anforderung an einen Hefestamm, welcher sich für die biotechnologische Herstellung von Squalen eignen soll, ist ein im Vergleich zum Wildtyp-Referenzstamm nicht stark eingeschränktes Wachstum. Deshalb wurde neben der Squalenproduktivität auch das Wachstums der konstruierten Hefestämme evaluiert.

Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse der Squalenquantifizierung mittels GC-MS Analyse, sowie Wachstumsdaten.

Tabelle 2: Optische Dichte (600 nm) der angegebenen Stämme nach 72h Kultivierung bezogen auf den Wildtyp, sowie Squalenproduktivität bezogen auf die Biotrockenmasse in %. Die OD, sowie die Squalenproduktivität wurde in Triplikaten gemessen. Der Fehler lag hierbei unter 5 %.

	Strain	Squalen/BTS [%]	OD600 nach 72h (bezogen auf WT)
1	AH22 <i>ura3</i> (Wildtyp)	~0,1	100 %
2	AH22 <i>tH3ura8</i> (Kontrollstamm)	9,8	107 %
3	AH22 <i>tH3ura8 Δare1Δare2</i>	11,2	106 %
4	AH22 <i>tH3ura8Δdga1Δlro1</i>	2,1	104 %

Tabelle 2 zeigt, daß im Stamm AH22*ura3* (Wildtyp) die Squalenmenge bei der GC-MS Analyse unterhalb des Detektionslimits war. Der Stamm AH22*tH3ura8* reichert unter den gewählten Kultivierungsbedingungen mindestens 9,8 % Squalen bezogen auf die Biotrockenmasse an. Stamm 3, welcher Deletionen der Gene *are1* und *are2* aufweist, zeigt die höchste Squalenproduktivität, mit bis zu 11,2 % bezogen auf die Biotrockenmasse. Dieser Stamm zeigt auch bezüglich der optischen Dichte am Ende der Kultivierung keine Einschränkungen des Wachstums.

Der beste Stamm AH22*tH3ura8Δare1Δare2* wurde neben dem Wildtyp und dem Kontrollstamm AH22*tH3ura8* auf weitere Wachstums- und Produktivitätsparameter evaluiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 und 4 dargestellt.

Tabelle 3: Optische Dichte der angegebenen Stämme nach 72h Kultivierung bezogen auf den Wildtyp, sowie Squalenproduktivität bezogen auf die Biotrockenmasse in %. Die Wachstum- und Saccharoseaufnahme- rate (in g verbrauchter Saccharose / g Biotrockenmasse * Stunde) wurde in der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt. Die OD, die Saccharoseaufnahme- rate, sowie die Squalenproduktivität wurde in Triplikaten gemessen. Der Fehler lag hierbei unter 5 %.

Strain	Squalen/BTS [%]	OD600 nach 72h	Wachstums- rate [h ⁻¹]	Saccharose- aufnahme- rate [g/g*h]
AH22 <i>ura3</i> (Wildtyp)	~0,1	100 %	0,23	1,31
AH22 <i>tH3ura8</i> (Kontrollstamm)	9,8	107 %	0,23	1,31
AH22 <i>tH3ura8 Δare1Δare2</i>	11,2	106 %	0,26	1,36

Die Ergebnisse in Tabelle 3 zeigen, daß der Stamm AH22*tH3ura8Δare1Δare2* bezüglich der Zelldichte zum Ende der Fermentation und der Wachstumsrate in der exponentiellen Phase ein verbessertes Wachstum gegenüber dem Wildtyp, sowie Stamm AH22*tH3ura8* aufweist. Auch die Saccharoseaufnahme- rate ist in diesen beiden Stamm deutlich erhöht.

Tabelle 4: Produktivität der angegebenen Stämme in Squalen / Biotrockenmasse [%], die Substratausbeute [%], die volumetrische- [g/L], sowie die Raum-Zeit- Ausbeute [g/l*t]. Die Extraktionsexperimente erfolgten in Triplikaten. Der Fehler lag hierbei unter 5 %.

Strain	Squalen/ BTS [%]	Squalen/ C- Quelle [%]	Squalen/ Fermentations volumen [g/L]	Squalen/ Fermentations- volumen*t [g/L *h]
AH22 <i>ura3</i> (Wildtyp)	0,1	<0,04	<0,02	0,000
AH22 <i>tH3ura8</i> (Kontrollstamm)	9,8	1,81	0,91	0,013
AH22 <i>tH3ura8 Δare1Δare2</i>	11,2	2,09	1,04	0,014

In Tabelle 4 ist zu sehen, daß die Squalenproduktivität im Stamm AH22*tH3ura8Δare1Δare2* deutlich erhöht ist. Dies gilt für die spezifische, die Substratausbeute, sowie für die volumetrische und die Raum-Zeit-Ausbeute.

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass Stämme mit Deletionen der für die Triacylglycerid-Biosynthese verantwortlichen Gene (*dga1* und *lro1*) eine stark verminderte Lipidproduktivität aufweisen. Möglicherweise ist das Fehlen der Veresterungsreaktion für freie Fettsäuren (zu Triacylglyceriden), welche für die Hefezelle potentiell toxisch sind, die Ursache hierfür.

Der Stamm AH22*tH3ura8Δare1Δare2* scheint für einen biotechnologischen Prozess zur Herstellung von Squalen gut geeignet. Die in diesem Stamm vorgenommenen genetischen Veränderungen führen bezüglich der Zelldichte zum Ende der Fermentation und der Wachstumsrate in der exponentiellen Phase zu einem verbesserten Wachstum gegenüber dem Wildtyp, sowie dem Ausgangs- oder Kontrollstamm AH22*tH3ura8*. Neben der Saccharoseaufnahme ist in diesem Stamm auch die Squalenproduktivität deutlich erhöht. Dies gilt für die spezifische, die Substratausbeute, sowie für die volumetrische und die Raum-Zeit-Ausbeute. Durch die Deletion der Gene *are1* und *are2* wurde zudem erreicht, daß keine potentiell verunreinigenden Sterylester mehr gebildet werden, was den Aufreinigungsprozess erheblich erleichtern dürfte.

4.2.4. Nilrot-Färbung der Zellen: Anfärbung der Lipidpartikel

Die Lipidpartikel in lebenden Hefezellen lassen sich durch den Farbstoff Nilrot anfärben und unter dem Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar machen (Fowler & Greenspan, 1985). Nilrot ist ein hydrophober Farbstoff der ausschließlich hydrophobe Bereiche in der Zelle, also vor allem die Lipidpartikel und die Plasmamembran, anfärbt und gelb bis golden fluoresziert. Für die folgenden Phasenkontrast- bzw. fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden die lebenden Zellen der entsprechenden Hefekultur nach einer 72 stündigen Kultivierung geerntet und für 15 min mit einer 1 % Nilrot in Ethanol Lösung inkubiert.

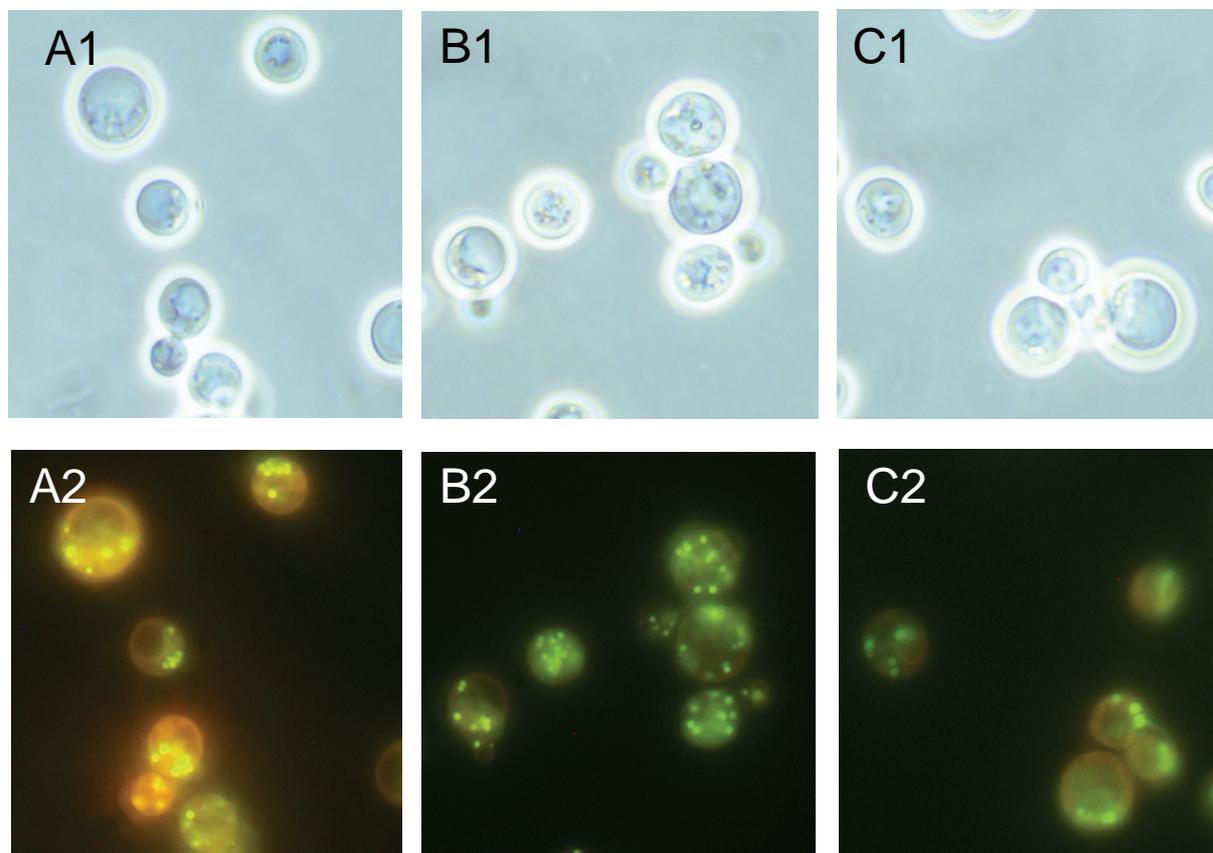


Abbildung 9: Phasenkontrast- (A1, B1, C1) und fluoreszenzmikroskopische (A2, B2, C2) Aufnahmen nach Nilrot-Färbung der Stämme AH22tH3ura8 (A1, A2), AH22tH3ura8are1are2 (B1, B2), AH22tH3ura8dgallrol (C1, C2). Die Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen jeweils denselben Bildausschnitt.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 9 zeigen deutlich die Gestalt und Anzahl der Lipidpartikel, welche als leuchtende Punkte bzw. Kompartimente in den Zellen zu sehen sind. Bezüglich der Form, Größe und Anzahl der Lipidpartikel ist in den Stämmen AH22tH3ura8 und AH22tH3ura8are1are2 kein signifikanter Unterschied zu erkennen.

Die Aufnahme C2 zeigt, daß die Zellen des Stammes AH22tH3ura8dgallrol weniger Lipidpartikel enthalten, als die Zellen der anderen beiden Stämme. Die DC- und GC-MS

Analyse hat ergeben, daß dieser Stamm keine Triglyceride und auch sehr wenig Squalen und Sterole im Vergleich zu *AH22tH3ura8* und *AH22tH3ura8are1are2* anreichert. Die Deletion der Gene *lro1* und *dga1* scheint zu einer Herabregulation der Lipidbiosynthese zu führen, was durch die geringere Anzahl der Lipidpartikel in diesem Stamm deutlich wird.

4.3. Prozessoptimierung

Im Rahmen der Prozessoptimierung sollte die Eignung der konstruierten Hefestämme für einen industriellen Prozess zur biotechnologischen Herstellung von Squalen gezeigt werden, sowie ein Produktionsprozess im Pilotmaßstab etabliert werden. Als Grundlage für die Entwicklung eines Pilotverfahrens zur Herstellung von Squalen wurden zunächst verschiedene Experimente im Schüttelkolben durchgeführt und ausgewertet.

Hieraus ergab sich, daß der Stamm *AH22ura8tH3are1are2* bei Kultivierung im 100 mL Schüttelkolben eine ca. 8-fach geringere Squalenproduktivität im Vergleich zur Kultivierung im 250 ml Schikanekolben aufweist. Der Sauerstoffeintrag bzw. der Sauerstoffpartialdruck scheint also essentiell für eine hohe Squalenproduktivität dieses Stammes zu sein, was bei der Fermentation im 5 L Maßstab (siehe Abb. 10 und 11) berücksichtigt wurde.

In weiteren Experimenten im Schüttelkolben konnte gezeigt werden, daß die untersuchten Squalen-produzierenden Hefestämme nach einer Kultivierungsdauer von 72 h keine weitere Anreicherung von Squalen mehr aufweisen (Daten hier nicht gezeigt).

Das Medium WMVIII weist ein für die Lipidbiosynthese optimales Stickstoff- zu Kohlenstoffverhältnis auf, weshalb dieses Medium auch für die Fermentation im 5 L Maßstab genutzt wurde.

Im weiteren Verlauf der Prozessoptimierung wurde eine Batch-Fermentation im 5 L Maßstab durchgeführt. Die Informationen dieser Fermentation stellen die Referenzdaten für weitere Optimierungsschritte im Rahmen der Prozessentwicklung dar und geben vor allem Aufschluss über das Wachstumsverhalten und die Squalenbildung über die Fermentationsdauer.

Es ist bekannt, dass die Anreicherung von Squalen von verschiedenen Prozessparametern abhängt. Neben den grundsätzlichen Fermentationsparametern sind insbesondere der Sauerstoff- und Stickstoffgehalt, sowie bestimmte Nährstofflimitierungen von Interesse, da diese Größen einen großen Einfluss auf die Squalenproduktion haben (Polakowski et al., 1998).

Fermentiert wurde der Stamm *AH22ura8tH3are1are2*. Dieser Stamm wurde gewählt, da er bezüglich der Parameter Squalen-, Nebenproduktbildung und Wachstum für die Squalenproduktion sehr gut geeignet scheint und ein repräsentativer Stamm für die Prozessentwicklung darstellt.

Die folgende Batch-Fermentation (Abbildung 10) ist ein typisches Beispiel für den Fermentationsverlauf unter optimierten Bedingungen. Sie wurde in einem Braun 5 L Fermenter (Biostat E) durchgeführt. Fermentiert wurde der Stamm *AH22ura8tH3are1are2* in 3 L WM8- Medium mit 5% Saccharose, supplementiert mit Uracil (100 mg/L), Histidin (100 mg/L) und Leucin (400 mg/L). Der Fermenter wurde mit einer 48 h Vorkultur beimpft (3%). Über die gesamte Fermentationsdauer blieb der pH-Wert unregelt und die Begasungsrate mit Druckluft wurde auf konstant 1,67 L/min gehalten.

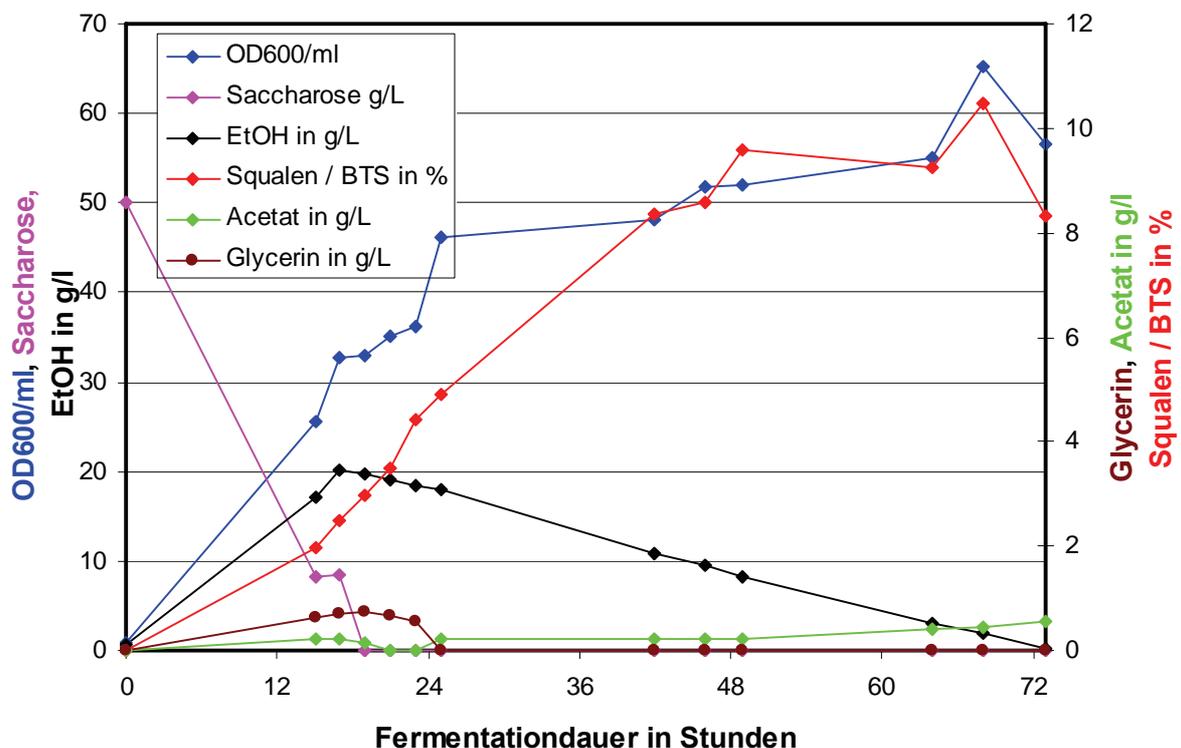


Abbildung 10: Verlauf der EtOH-, Acetat-, Glycerin- und Saccharosekonzentration, der OD600/ml und des Squalengehaltes bezogen auf die BTS während einer 73-stündigen Satzkultivierung in einem 5 L Fermenter (Braun, Biostat E). Fermentiert wurde der Stamm *AH22ura8tH3are1are2* in 3 L WM8- Medium mit 5% Saccharose supplementiert mit Uracil (100 mg/L), Histidin (100 mg/L) und Leucin (400 mg/L). Der Fermenter wurde mit einer 48 h Vorkultur angeimpft (3%). Über die gesamte Fermentationsdauer blieb der pH-Wert unregelt und die Begasungsrate mit Druckluft wurde auf konstant 1,67 L/min gehalten.

Abbildung 10 zeigt den typischen zwei-phasigen Wachstumsverlauf einer Crabtree-positiven Hefe. Zunächst wird sämtliche Saccharose (bzw. Glucose) innerhalb der ersten ca. 18 Stunden verbraucht und daraus Biomasse (exponentielles Wachstum) und Ethanol gebildet. Etwa

zwischen Stunde 18 und 23 stellt die Hefe ihren Metabolismus von Fermentation auf Respiration um (diauxischer Shift), um dann in der zweiten Phase zwischen Stunde 23 und 68 das in der ersten Wachstumsphase gebildete Ethanol veratmen zu können, wobei die Biomasse wieder zunimmt. In Abbildung 10 ist zu sehen, daß die Hefezellen etwa die Hälfte des Squalens in der ersten Wachstumsphase auf Saccharose (bzw. Glucose) anreichern, die andere Hälfte während der zweiten Wachstumsphase auf Ethanol. Die Konzentration an Glycerin und Acetat im Kulturüberstand bleibt während der gesamten Fermentation unter 1 g/L und somit ist die Bildung dieser Fermentationsnebenprodukte vernachlässigbar.

Nach 68 h wurde ein Spitzen OD_{600nm}-Wert von 65 gemessen. Dieser Wert ist höher als der OD-Wert für denselben Stamm nach einer 72 h Kultivierung im Schüttelkolben. Die höhere Zelldichte ist auf die besseren Bedingungen im Fermenter, vor allem im Bezug auf die Sauerstoffverfügbarkeit, zurückzuführen.

Es ist zu beachten, daß die rote Kurve in Abb. 10 nicht die absolute Squalenmenge repräsentiert, sondern den Squalengehalt bezogen auf die Biotrockenmasse in %, also den Grad der Squalenanreicherung in der Zelle. Bezüglich der Squalenanreicherung ist nach ca. 70 h im Fermenter ein Spitzenwert von gut 10 % Squalen bezogen auf die Biotrockenmasse erreicht. Aus Abbildung 10 geht hervor, daß diese Anreicherung nach ca. 70 h maximal ist. Zu diesem Zeitpunkt ist auch die Zelldichte und somit die absolute Squalenmenge am höchsten. Zwischen 68 h und 73 h nimmt sowohl die Zelldichte, als auch die Squalenmenge in der Zelle wieder ab. Somit ist nach einer Fermentationsdauer von ca. 70 h der optimale Erntezeitpunkt erreicht. Abbildung 11 zeigt den Verlauf des pH-Wertes und des Sauerstoffpartialdruckes während der Fermentation.

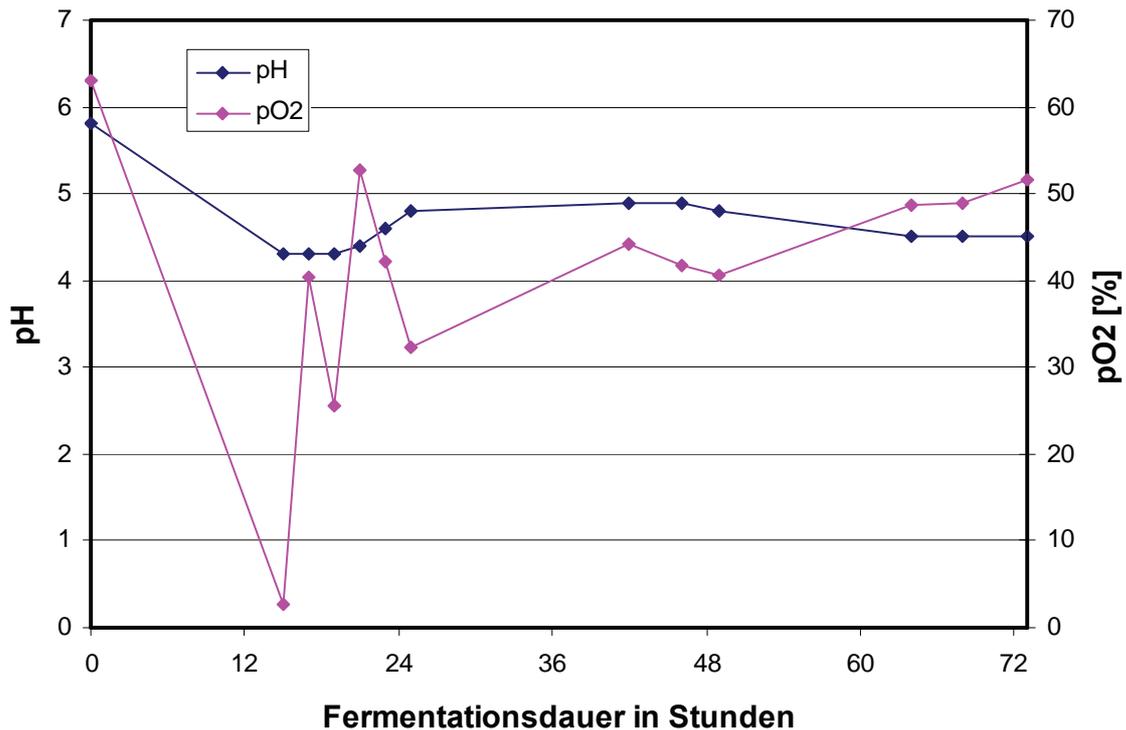


Abbildung 11: Verlauf des pH-Wertes und des Sauerstoffpartialdruckes während einer 73-stündigen Satzkultivierung in einem 5 L Fermenter (Braun, Biostat E). Fermentiert wurde der Stamm AH22ura8tH3are1are2 in 3 L WM8- Medium mit 5% Saccharose supplementiert mit Uracil (100 mg/L), Histidin (100 mg/L) und Leucin (400 mg/L). Der Fermenter wurde mit einer 48 h Vorkultur angeimpft (3%). Über die gesamte Fermentationsdauer blieb der pH-Wert ungerregelt und die Begasungsrate mit Druckluft wurde auf konstant 1,67 L/min gehalten.

In Abbildung 11 ist zu sehen, daß der pH-Wert im Verlauf der Fermentation von 5,8 auf ca. 4,5 absinkt. Der Sauerstoffpartialdruck ist im Zuge des exponentiellen Wachstums bis auf unter 10 % abgesunken. Nach Erhöhung der Rührerdrehzahl stieg dieser Wert wieder auf annähernd 50 %.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß der Stamm AH22ura8tH3are1are2 während der Fermentation im 5 L Maßstab unter den gewählten Bedingungen ein solides Wachstum und eine gute Squalenproduktivität aufweist. Es wurde eine optische Dichte (600nm) von 65 erreicht (entspricht 10,8 g / l Biotrockenmasse) und eine Squalenanreicherung bezogen auf die Biotrockenmasse von ca. 10 %. Squalen wird sowohl in der ersten Wachstumsphase auf Glucose angereichert, als auch während der zweiten Wachstumsphase auf Ethanol.

Die Fermentation konnte erfolgreich auf den 100L Maßstab übertragen werden.

4.4. NMR-Analyse des Squalens aus Hefe

Eine NMR-Analyse des Squalens aus Hefe wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Struktur mit der des Squalens aus Haifischleber-Öl übereinstimmt. Für viele Anwendungen des Squalens, wie zum Beispiel als Adjuvanz in Impfstoffen, ist diese Strukturübereinstimmung essentiell.

Eine Squalenprobe (etwa 1 mg) wurde aus dem Stamm *AH22ura3pFlat1-tHMG* mit Chloroform:Methanol (80:20 vol.-%) extrahiert, per HPLC fraktioniert, unter Vakuum eingengt und zur NMR-Analyse an die Firma “Analytical Services“ (Aachen) verschickt. Als Referenz wurde Squalen von Sigma-Aldrich, welches aus Haifischleber-Öl gewonnen wird, verwendet.

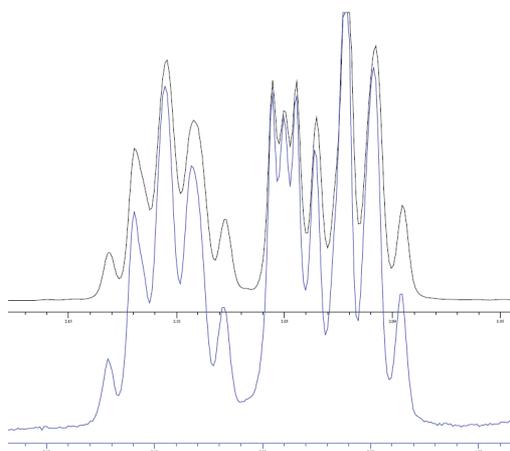


Abbildung 12: Overlay des ¹H-NMR Spektrums der Probe aus Hefe (blau) und des Referenzmaterials (schwarz)

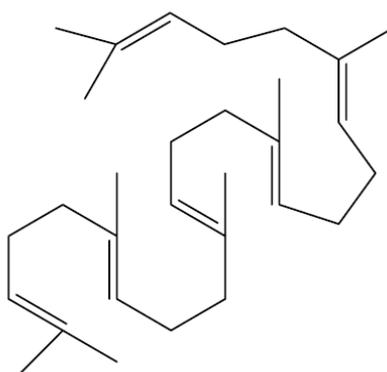


Abbildung 13: Strukturvorschlag für die eingeschickte Squalenprobe auf Basis der NMR-Messungen

Die Auswertung sämtlicher NMR-Spektren (¹H, ¹³C, HSQC) zeigt, daß die Struktur der Probe und der analysierten Referenz identisch sind.

Die Struktur weist die Haifisch-Squalen analoge Konfiguration auf, bei welcher alle Doppelbindungen trans (*E*) zueinander stehen, was in der Sessel-Boot-Sessel-Boot Konformation resultiert.

Aufgrund des gleichen Isomerisierungszustandes kann Squalen aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* das Squalen aus Haifischleber-Öl bei entsprechenden Anwendungen prinzipiell ersetzen.

5. Diskussion

Der vorliegende Bericht umfasst die Ergebnisse des DBU- geförderten Projektes “Innovatives Verfahren zu Herstellung von Squalen mit Hefe“.

Es wurden Stämme mit einer transkriptionell und auf Proteinebene deregulierten HMG-CoA-Reduktase konstruiert, in welchen die Gene, welche für die Triacylglycerid- und Sterylesterbiosynthese verantwortlich sind (*dgal*, *lrol*, *are1*, *are2*), in verschiedenen Kombinationen deletiert wurden.

Während im Wildtypstamm AH22*ura3* per GC-MS Analyse kein Squalen nachweisbar war, reichert der Stamm AH22*ura8tH3* im Schüttelkolben nach 72 h in WM8 Medium 9,8 % Squalen/BTS an (siehe Tabelle 3). Durch Überexpression einer deregulierten HMG-CoA-Reduktase wird also eine Anreicherung von Squalen in den Lipidpartikeln erreicht.

Die Menge an Squalen/BTS konnte im Stamm AH22*ura8tH3are1are2* auf 11,2 % gesteigert werden. Gleichzeitig hat die Deletion der Gene *are1* und *are2*, wie erwartet, zur Folge, daß keine Sterylester mehr gebildet werden (Abb. 6 und 8). Die Ergebnisse der DC-Analyse und der Analyse der Lipidpartikel (Abb. 6 und 8) zeigen auch, daß AH22*ura8tH3dgal1lrol* keine Triacylglyceride mehr synthetisiert. Die Deletion von *dgal* und *lrol* führt jedoch zu einer Reduktion des Squalengehaltes bis auf 2,1 % der BTS (Tab. 2). Die Ausschaltung der für die Triacylglycerid-Biosynthese verantwortlichen Gene (*dgal* und *lrol*) scheint zu einer Herabregulation der Lipidbiosynthese zu führen. Möglicherweise ist hier das Fehlen der Veresterungsreaktion für freie Fettsäuren (zu Triacylglyceriden), welche für die Hefezelle potentiell toxisch sind, die Ursache hierfür.

Die Analyse der Zusammensetzung der Lipidpartikel in den modifizierten Hefestämmen ergab, daß das überproduzierte Squalen in den Lipidpartikeln angereichert wird. Dies war zu erwarten, da der andere potentielle Speicherort für Squalen, die Plasmamembran, eine sehr geringe Speicherkapazität aufweist.

Die Ergebnisse in Tabelle 3 zeigen, daß der Stamm AH22*tH3ura8Δare1Δare2* bezüglich der Zelldichte zum Ende der Fermentation und der Wachstumsrate in der exponentiellen Phase ein verbessertes Wachstum gegenüber dem Wildtyp, sowie Stamm AH22*tH3ura8* aufweisen. Auch die Saccharoseaufnahme ist in diesem Stamm deutlich erhöht. In Tabelle 4 ist zu sehen, daß die Squalenproduktivität im Stamm AH22*tH3ura8Δare1Δare2* deutlich erhöht ist. Dies gilt für die spezifische-, die Substratausbeute, sowie für die volumetrische und die Raum-Zeit-Ausbeute. Durch die Deletion der Gene *are1* und *are2* wurde zudem erreicht, daß keine potentiell verunreinigenden Sterylester mehr gebildet werden, was den Aufreinigungsprozess erheblich erleichtern dürfte.

Der Stamm AH22*tH3ura8Δare1Δare2* scheint für einen biotechnologischen Prozess zur Herstellung von Squalen demnach am besten geeignet.

Im Rahmen der Prozessoptimierung konnte die Eignung der konstruierten Hefestämme für einen industriellen Prozess zur biotechnologischen Herstellung von Squalen gezeigt werden, sowie ein Produktionsprozess im Pilotmaßstab etabliert werden (Abb. 10 bis 11). Dieser Pilotprozess stellt eine Basis für die Umsetzung des Prozesses im industriellen Maßstab dar. Squalen wird von den konstruierten Hefestämmen auf fermentierbaren und nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen produziert, was eine hohe Variabilität bezüglich der eingesetzten Kohlenstoffquelle gewährleistet.

Als weitere Schritte der Prozessoptimierung, über die Laufzeit der DBU-Förderung hinaus, bieten sich die Evaluierung verschiedener Feeding-Strategien und Fermentationen unter bestimmten Limitierungen, wie Stickstoff oder Uracil Limitierung an, was zu einer erhöhten Squalenproduktivität führen kann (Polakowski et al., 1998).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das Konzept der Anreicherung von Squalen in den Lipidpartikeln durch Überexpression einer deregulierten HMG-CoA-Reduktase bei gleichzeitiger Ausschaltung der Synthese unerwünschter neutraler Lipide, wie Triacylglyceride und Sterylester, durch Deletion der entsprechenden Gene umgesetzt werden konnte. Im Rahmen des vorliegenden Projektes konnten Hefestämme konstruiert werden, welche sich bezüglich Produktivität, Wachstum und Stabilität hervorragend für einen industriellen Prozess zur biotechnologischen Herstellung von Squalen eignen. Ein Pilot-Prozess zur Fermentation eines Squalen-überproduzierenden Hefestammes wurde etabliert. Das Squalen aus den Hefe-Stämmen weist dieselbe Isomerie wie Squalen aus Haifischleber-Öl auf.

Eine entsprechende Patentanmeldung zum Schutz der konstruierten Hefe-Stämme wird beim europäischen Patentamt eingereicht.

Die verfolgten Ziele des Projektes wurden erreicht.

Herstellung von Squalen in Hefe		Jahr 1	Jahr 2		
a) Stammherstellung		[Gantt bar spanning both years]			
b) Verfahren zur Isolation von Lipidpartikeln			[Gantt bar in Year 2]		
c) Analytik zur Bestimmung des Reinheitsgrads		[Gantt bar in Year 1]			
d) Bestimmung des Isomerisierungszustandes von Squalen aus Hefen			[Gantt bar in Year 1]		
e) Entwicklung eines Pilot-Prozesses zur Fermentation eines Squalenüberproduzierenden Hefestammes		[Gantt bar spanning both years]			

Abbildung 14: Zeitplan, entnommen aus dem Antrag zum Projekt “Innovatives Verfahren zur Herstellung von Squalen mit Hefe“.

6. Öffentlichkeitsarbeit

Im Rahmen des vorliegenden Projektes konnten Hefestämme konstruiert werden, welche sich bezüglich Produktivität, Wachstum und Stabilität hervorragend für einen industriellen Prozess zur biotechnologischen Herstellung von Squalen eignen. Ein Pilot-Prozess zur Fermentation eines Squalen-überproduzierenden Hefestammes wurde etabliert.

Ein entsprechendes Patent zum Schutz der konstruierten Hefe-Stämme wird beim europäischen Patentamt eingereicht.

Auf der Basis der erarbeiteten Daten konnte ein Kooperationsvertrag zwischen der ORGANOBALANCE GmbH und einem Partner aus der Pharmaindustrie abgeschlossen werden.

Die Publikation der Daten zur Stammkonstruktion und zur Prozessetablierung ist in Vorbereitung und wird in Absprache mit dem Kooperationspartner erfolgen.

7. Fazit

Das DBU- geförderte Projekt “Innovatives Verfahren zu Herstellung von Squalen mit Hefe“ verlief für die ORGANOBALANCE GmbH sehr erfolgreich.

Es konnten Hefestämme mit einer sehr hohen Squalenproduktivität (bis 11,2 % Squalen / Biotrockenmasse) und gegenüber dem Wildtyp verbesserten Wachstumseigenschaften konstruiert werden. Diese Stämme synthetisieren keine Sterylester mehr, was zu einer erhöhten Produktreinheit führt. Das Konzept der Anreicherung von Squalen in den Lipidpartikeln durch Überexpression einer deregulierten HMG-CoA-Reduktase bei gleichzeitiger Ausschaltung der Synthese unerwünschter neutraler Lipide, wie Triacylglyceride und Sterylester, durch Deletion der entsprechenden Gene konnte umgesetzt werden.

Das Squalen aus den Hefe-Stämmen weist dieselbe Isomerie wie Squalen aus Haifischleber-Öl auf. Ein Prozess im Pilot-Maßstab (5 L und 100 l) konnte etabliert werden.

Ein entsprechendes Patent zum Schutz der konstruierten Hefe-Stämme wird beim europäischen Patentamt eingereicht.

8. Literatur

- Basson, M.E., Thorsness, M., Finer-Moore, J., Stroud, R.M., Rine, J. (1988) Structural and functional conservation between yeast and human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductases, the rate-limiting enzyme of sterol biosynthesis. *Mol. Cell. Biol.* 8; 3793-3808.
- Baum, J. K., Myers, R. A. (2003) Shifting baselines and the decline of pelagic sharks in the Gulf of Mexico *Ecology Letters*. 7(2); 135.
- Baum, J. K., Myers, R. A., Kehler, D. G., Worm, B., Harley, S. J. Doherty, P. A. (2003) Collapse and Conservation of Shark Populations in the Northwest Atlantic. *Science*: 1079777.
- Bennetzen, J. L., Hall, B. D. (1982) The primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 257; 3018-3025.
- Boeke, J. D., Trueheart, J., Natsoulis, G., Fink, G. (1987) 5-Fluorootic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods in Enzymology* 154; 164-175.
- Fowler, S. D. & Greenspan, P. (1985). Application of Nile red, a fluorescent hydrophobic probe, for the detection of neutral lipid deposits in tissue sections: comparison with oil red O. *J Histochem Cytochem* 33, 833-836.
- Fei, W., G. Shui, B. Gaeta, X. Du, L. Kuerschner, P. Li, A. J. Brown, M. R. Wenk, R. G. Parton and H. Yang (2008). "Fld1p, a functional homologue of human seipin, regulates the size of lipid droplets in yeast." *J Cell Biol* 180(3): 473-82.
- Guldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J., Hegemann, J.H. (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* 24(13); 2519-2524..
- Mortimer, R. K., Johnston, J. R. (1986) Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics* 113; 35-43.
- Lang C., Looman A.C. (1995) Efficient expression and secretion of *Aspergillus niger* RH5344 polygalacturonase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44; 147-156.
- Blom, J., M. J. De Mattos and L. A. Grivell (2000). "Redirection of the respiro-fermentative flux distribution in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of the transcription factor Hap4p." *Appl Environ Microbiol* 66(5): 1970-3.
- De Vit, M. J., J. A. Waddle and M. Johnston (1997). "Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor." *Mol Biol Cell* 8(8): 1603-18.
- Haurie, V., M. Perrot, T. Mini, P. Jenö, F. Sagliocco and H. Boucherie (2001). "The transcriptional activator Cat8p provides a major contribution to the reprogramming of carbon metabolism during the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 276(1): 76-85.

- Jensen-Pergakes, K., Z. Guo, M. Giattina, S. L. Sturley and M. Bard (2001). "Transcriptional regulation of the two sterol esterification genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *J Bacteriol* 183(17): 4950-7.
- McNabb, D. S. and I. Pinto (2005). "Assembly of the Hap2p/Hap3p/Hap4p/Hap5p-DNA complex in *Saccharomyces cerevisiae*." *Eukaryot Cell* 4(11): 1829-39.
- Oelkers, P., D. Cromley, M. Padamsee, J. T. Billheimer and S. L. Sturley (2002). "The DGA1 gene determines a second triglyceride synthetic pathway in yeast." *J Biol Chem* 277(11): 8877-81.
- Rubenstein, E. M., R. R. McCartney and M. C. Schmidt (2006). "Regulatory domains of Snf1-activating kinases determine pathway specificity." *Eukaryot Cell* 5(4): 620-7.
- Treitel, M. A. and M. Carlson (1995). "Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(8): 3132-6.
- Treitel, M. A., S. Kuchin and M. Carlson (1998). "Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 18(11): 6273-80.
- Young, E. T., K. M. Dombek, C. Tachibana and T. Ideker (2003). "Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8." *J Biol Chem* 278(28): 26146-58.
- Parks L.W., Bottema C.D.K., Rodriguez R.J., Lewis T.A. (1985) Yeast sterols: yeast mutants as tools for the study of sterol metabolism. *Meth. Enzymol.* 111; 333-346.
- Parks L.W., Smith S.J., Crowley J.H. (1995) Biochemical and physiological effects of sterol alterations in yeast--a review. *Lipids*; 227-230.
- Polakowski, T., Stahl, U., Lang, C. (1998) Overexpression of a cytosolic hydroxymethylglutaryl-CoA reductase leads to squalene accumulation in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol.* 49(1); 66-71.
- Polakowski, T., Bastl, R., Stahl, U., Lang, C. (1999) Enhanced sterol-acyl transferase activity promotes sterol accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 53(1); 30-35.
- Ruohonen, L., Aalto, M.K., Keranen, S. (1995) Modifications to the ADH1 promoter of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of heterologous proteins. *Journal of Biotechnology* 39; 193-203.
- Siduh, R. S., Bollon, A. P. (1990) Bacterial plasmid pBR322 sequences serve as upstream activating sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 6; 221-229.
- Tschumper, G., Carbon, J. (1980) Sequence of a yeast DNA fragment containing a chromosomal replicator and the TRP1 gene. *Gene* 10; 157-166.
- Veen, M., Lang, C. (2005) Interactions of the ergosterol biosynthetic pathway with other lipid pathways. *Biochem Soc Trans.* 33(5); 1178-1181.

Veen, M., Lang, C. (2004) Production of lipid compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 63(6); 635-646.

Veen, M., Stahl, U., Lang, C. (2003) Combined overexpression of genes of the ergosterol biosynthetic pathway leads to accumulation of sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 4(1); 87-95.

Wagner, A., Daum, G. (2005) Formation and mobilization of neutral lipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Soc Trans.* 33(5); 1174-1177.

Yang, H., Bard, M., Bruner, D.A., Gleeson, A., Deckelbaum, R.J., Aljinovic, G., Pohl, T.M., Rothstein, R., Sturley, S.L. (1996) Sterol esterification in yeast: a two-gene process. *Science.* 272(5266); 1353-1356.