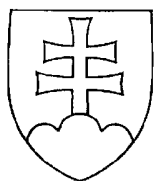


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA**

- (22) Dátum podania prihlášky: **28. 5. 2002**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **01202013.7**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **28. 5. 2001**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **EP**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **7. 7. 2004**
Vestník ÚPV SR č.: **7/2004**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/NL02/00340**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO02/097063**

(11), (21) Číslo dokumentu:

1633-2003

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.7 :

**C12N 1/00,
C12N 15/09,
C12P 13/02,
C12P 17/18,
C12P 7/44,
A61K 35/66,
A23L 1/302,
A23L 1/302,
A23L 1/305**

- (71) Prihlasovateľ: **Campina B.V., Zaltbommel, NL;**
(72) Pôvodca: **Sybesma Wilbert Feike Henricus, Wageningen, NL;**
Hugenholtz Jeroen, Bennekom, NL;
Mierau Igor, Loenen, NL;
Starrenburg Maria Johanna Catharina, Bennekom, NL;
Kleerebezem Michiel, Ede, NL;
De Vos Willem Meindert, Benneko, NL;
(74) Zástupca: **PATENTSERVIS BRATISLAVA, a. s., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Mikroorganizmy so zvýšenou produkciou a zvýšenou biodostupnosťou folátu**

- (57) Anotácia:
Opísaný je postup na produkciu biodostupného folátu, t. j. kyseliny listovej, ktorá má zvýšený podiel monoglutamylfolátu, kultivovaním mikroorganizmov vhodných na potravinárske účely, ktoré obsahujú aktívnu heterológnu alebo homológnu polyglutamylhydrolázovú aktivitu alebo obsahujú zvýšené aktivity enzýmov na biosyntézu folátu. Gény kódujúce polyglutamylhydrolázu a enzýmy na biosyntézu folátu môžu byť rôzneho pôvodu, napr. z hlodavcov alebo iných cicavcov, vrátane človeka. Opísané sú aj potraviny, predovšetkým mliečne výrobky, ktoré obsahujú tieto mikroorganizmy produkujúce monoglutamylfolát.

Mikroorganizmy so zvýšenou produkciou a zvýšenou biodostupnosťou folátu

Oblasť techniky

Vynález sa týka zvýšenej produkcie folátu, špecificky biodostupného folátu, t.j. folátu, ktorý je ľahko vstrebateľný cicavčím gastrointestinálnym traktom, a to s použitím geneticky modifikovaných mikroorganizmov.

Doterajší stav techniky

Folát (kyselina N-[4-{{(2-amino-1,4-dihydro-4-oxo-6-pteridinylyl)metyl}amino}benzoyl]-L-glutámová; vitamín B11; vitamín M) je hematopoetický vitamín, o ktorom sa stále častejšie usudzuje, že hrá dôležitú úlohu v ochrane zdravia a uzdravovaní ľudí aj zvierat. Cicavce nevedia folát vytvárať. Hlavnými zdrojmi folátu sú rastliny, predovšetkým špenát a iná listová zelenina, trávy, kvasinky a ďalšie mikroorganizmy a nepriamo živočíšne orgány (ľadviny, pečeň). Dopĺňanie folátu sa v súčasnosti uskutočňuje jeho priamym podávaním alebo vo forme vitamínových prípravkov. Avšak podávanie týchto vitamínov ako potravinových doplnkov je nákladné a nie vždy prijateľné.

Folát je všeobecný názov pre veľké množstvo rôznych derivátov kyseliny listovej, ktoré sa líšia oxidačným stavom, substitúciou jedného uhlíka v pteridínovom kruhu a počtom glutamátových zvyškov. Tieto rozdiely sa prejavujú v rôznych fyzikálno-chemických vlastnostiach, ktoré spolu s určitými zložkami potravy môžu ovplyvňovať biodostupnosť folátu. Jedným z dôležitých faktorov ovplyvňujúcich biodostupnosť folátu je jeho stabilita. Vystavením kyslíku, teplu a najmä kyslému tráviacemu prostrediu žalúdka sa

nestabilita folátu zvyšuje. Antioxidanty prítomné v potrave, ako sú kyselina askorbová a redukujúce tioly, chránia foláty pred touto nestabilitou.

Ďalším faktorom ovplyvňujúcim biodostupnosť folátu je prítomnosť polyglutamylových zvyškov na folátoch. Dostupné informácie naznačujú, že biodostupnosť monoglutamyl-folátu je vyššia ako biodostupnosť polyglutamyl-folátu. Polyglutamyl-foláty musia byť pred absorpciou v čreve hydrolyzované, aby sa z nich stali príslušné monoglutamyl-deriváty. Táto premena je katalyzovaná črevnými hydrolázami. Avšak tieto enzýmy sú citlivé na inhibíciu určitými zložkami nachádzajúcimi sa v niektorých potravinách. Navyše by mohla byť aktivita týchto enzýmov ovplyvnená aj dĺžkou glutamátového reťazca (Gregory, 1989). Záverom možno teda konštatovať, že prítomnosť folátu ako monoglutamyl-derivátu zvyšuje biodostupnosť folátov.

Folát je prítomný v potravinárskych výrobkoch, ako sú mäso, zelenina a mliečne výrobky. Množstvo monoglutamyl-folátov a teda biodostupnosť folátu v rôznych potravinách, je veľmi odlišné, napr. ako bolo zistené u vaječného žltka (72 % monoglutamyl-folátov, MGF), hovädzej pečene (56 % MGF), pomarančového džúsu (21 % MGF), kapusty (6 % MGF), fazule mesačnej (5 % MGF) a šalátu (menej ako 1 % MGF) (Seyoum a Selhub, 1998).

Intracelulárne uložený folát v baktériách mliečneho kysnutia je prevažne prítomný ako polyglutamyl-folát. V mikroorganizmoch je jednou z funkcií glutamátového konca u polyglutamyl-folátov zadržiavanie folátov v bunke (Shane a Stokstad, 1975). Výsledkom je možnosť, že pri predchode baktérii gastrointestinálnym (GI) traktom polyglutamyl-foláty zostávajú vo vnútri baktérií a nie sú tak dostupné pre prijatie ľudským organizmom. Tento problém môže byť vyriešený zvýšením množstva monoglutamyl-folátu, s následným znížením zadržiavaného, intracelulárne uloženého folátu.

Folát môže byť syntetizovaný z prekursorov GTP, kyseliny para-amino-benzoovej a glutamátu dráhou zahŕňajúcou mnoho enzýmov (pozri obrázok 1). Niektoré mikroorganizmy, vrátane baktérie mliečneho kysnutia *Lactococcus lactic*, majú gény pre túto dráhu - *gch*, *folC*, *folP*, *dhna*, *hppk* a *dhfr* - organizované do génovej skupiny. GTP-cyklohydroláza I (*gch*, EC 3.5.4.16) katalyzuje reakciu od GTP k dihydroneopterín-trifosfátu cez medziprodukt, pričom sa uvoľní mravčan. Fosfátový zvyšok je následne odstránený pravdepodobne pôsobením fosfatázy (Pasa). Pôsobením dihydroneopterínaldolázy (EC 4.1.2.25) na produkt predchádzajúcej reakcie vznikne glykolaldehyd a 6-hydroxymetyl-7,8-dihydropterín, ktorý je premenený na 6-hydroxymetyl-7,8-dihydropterín-pyrofosfát pôsobením 2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymetyldihydropteridínpyrofosfokinázy (*hppk*, EC 2.5.1.15). Dihydropteroátsyntáza (*dps*, *folP*, EC 2.7.6.3.) pripája para-amino-benzoát, pričom vznikne 7,8-dihydropteroát. Folátsyntáza (*folC*, EC 6.3.2.17) spája glutamát s dihydropteroátom, pričom vznikne dihydrofolát. Následnou redukciou tetrahydrofolátu dihydrofolátreduktázou (*dhfr*, EC 1.5.1.3) a pridaním glutamátu na karboxylovú skupinu vedľajšieho reťazca predtým folylglutamátsyntázou spojených glutamátových zvyškov (*folC*, EC 6.3.2.17) nakoniec vzniká polyglutamyl-tetrahydrofolát (nie je znázornený na obr. 1).

WO 01/00845 obsahuje informácie o sekvenciách štyroch enzýmov zúčastňujúcich sa syntézy folátu u *Corynebacterium glutamicum*: GTP-cyklohydrolázy I (Fol E), dihydropteroátsyntázy (Fol B), dihydroneopterínaldolázy (Fol P) a 2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymetyldihydropteridínpyrofosfokinázy (Fol K). Je tu tiež navrhované vnieť tieto gény z *Corynebacterium* do *Corynebacterium* alebo iných mikroorganizmov, avšak bez akéhokoľvek upresnenia, ktoré špecifické gény majú byť použité alebo aký výsledok má byť

očakávaný. Naviac je genómové usporiadanie génov kódujúcich tieto enzýmy veľmi odlišné oproti *Corynebacterium* a ostatným mikroorganizmom, ako sú *Bacillus*, baktérie mliečneho kysnutia a kvasinky.

Podstata vynálezu

Nedávno bolo objavené, že mikroorganizmy môžu byť pripravené tak, aby boli schopné produkovať nielen viac folátu, ale aj folát v biodostupnej podobe. Preto vynález poskytuje na potravinárske účely vhodné rekombinantné mikroorganizmy, ktoré sú schopné produkovať polyglutamyl-folát a ktoré obsahujú aktívny heterológny a homológny gén pre gama-glutamylhydrolázu alebo geneticky modifikované organizmy schopné produkovať nielen viac folátu nadprodukciou biosyntetických génov, ale tiež relatívne nižšie množstvo polyglutamyl-folátov, čím je uprednostnená exkrécia folátu do prostredia. Vynález ďalej poskytuje expresné kazety, ktoré obsahujú gén pre gama-glutamylhydrolázu s vhodnými, výhodne mikrobiálnymi regulačnými sekvenciami a postup na produkciu folátu kultiváciou mikroorganizmov, ktoré folát produkujú a obsahujú takúto expresnú kazetu. Vynález tiež poskytuje potraviny, najmä mliečne výrobky, ako je jogurt a ďalšie fermentované potraviny, ktoré obsahujú mikroorganizmy produkujúce veľké množstvá biodostupného folátu.

Podrobný opis vynálezu

Vynález sa týka zvyšovania produkcie folátu, špecificky biodostupného folátu, t.j. folátu, ktorý môže byť ľahko vstrebaný cicavčím gastrointestinálnym traktom. Vynález je zameraný na zvýšenie produkcie rôznych folátových derivátov a premenu rôznych derivátov polyglutamyl-folátu, ako je to u organizmov *in vivo*, na príslušné deriváty monoglutamyl-folátu. Vynález preto predovšetkým:

1. mení pomer medzi derivátmi polyglutamyl-folátu a monoglutamyl-folátu v prospech derivátov monoglutamyl-folátu a tým všeobecne zvyšuje biodostupnosť folátových derivátov, konkrétnejšie derivátov monoglutamyl-folátu.
2. obmedzuje zadržiavanie folátových derivátov u hosťiteľských buniek produkujúcich folát a tým sa potencuje zvýšená difúzia alebo transport folátu do extracelulárneho prostredia. Výsledkom je zvýšená biodostupnosť folátu, pretože intracelulárne uložený folát nie je dostupný príjmu v cicavčím gastrointestinálnom trakte.
3. vynález umožňuje vyššiu celkovú produkciu folátu bunkami.

Vynález sa preto týka mikroorganizmov, ktoré sú schopné produkovať vyššie hladiny intracelulárneho folátu nadprodukciou homológnych alebo heterológnych enzýmov zúčastňujúcich sa biosyntézy monoglutamyl-folátu, alebo ktoré obsahujú aktívny heterológny gén pre glutamylhydrolázu. Aktívnym génom pre glutamylhydrolázu sa rozumie gén, ktorý pri expresii produkuje enzým schopný dekonjugovať polyglutamyl-foláty na monoglutamyl-foláty.

Gény na biosyntézu folátu, ktoré sú použité podľa tohto vynálezu, môžu byť vybrané z nasledovných génov prítomných vo folátovej génovej skupine: GTP-cyklohydroláza I (gch), dihydroneopterináldoláza (dhna) a 2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymetyldihydropteridínpyrofosfokináza (hppk), alebo ich kombinácia ako gch a hppk. Pozmenená enzymatická aktivita môže byť výsledkom pozmenenej expresie enzýmov kódovaných vyššie uvedenými génmi, napr. prítomnosťou viacerých kópií homológnych alebo heterológnych génov a/alebo prítomnosťou silných promótorov u týchto génov. Pozmenená aktivita môže byť zvýšená aktivita alebo znížená aktivita, každá z nich však vedie k relatívnemu zvýšeniu produkcie monoglutamyl-folátu.

Bolo objavené, že zvýšená expresia dihydropteroátsyntázy (dps) nevedie k zvýšenej produkcii folátu a že zvýšená expresia dihydrofolátreduktázy (dhfr) dokonca vedie k zníženej produkcii folátu. Najvýhodnejším génom na zvýšenie produkcie folátu je podľa tohto vynálezu gch.

Glutamylhydrolázou môže byť endopeptidáza, t.j. glutamylhydroláza, ktorá pôsobí vo vnútri polyglutamylového reťazca a tak odstraňuje polyglutamylový reťazec v jednom kroku. Glutamylhydrolázou môže byť aj exopeptidáza, t.j. enzým, ktorý odštiepuje glutamylové zvyšky z konca polyglutamylového reťazca a tak uvoľňuje monoglutamylové zvyšky v opakujúcich sa krokoch. Gény pre endo-glutamylhydrolázu môžu pochádzať napr. z krysy, zatiaľ čo gény pre exo-glutamylhydrolázu sú dostupné napr. z ľudského zdroja.

Génom pre glutamylhydrolázu a génmi pre biosyntézu folátu vnášanými do mikroorganizmov môžu byť pôvodné (nemodifikované) gény. Môže ísť aj o modifikované gény, ktoré minimálne obsahujú oblasť kódujúcu katalytickú doménu glutamylhydrolázy a biosyntézu folátu. Najmä glutamylhydroláza kódovaná heterológym génom má najmenej 65% sekvenčnú identitu a hlavne najmenej 75% identitu - stanovené pomocou konvenčného algoritmu BLAST - s aminokyselinovými sekvenciami krysej alebo ľudskej gama-glutamylhydrolázy opísanej v Yao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93(19): 10134-8 a J. Biol. Chem. 1996, 271(15): 8525-8, a/alebo jej kódujúca sekvencia je schopná hybridizovať v stringentných podmienkach s nukleotidovými sekvenciami, opísané v Yao et al.

Termín "folát" zahŕňa kyselinu listovú a akúkoľvek soľ, ester a derivát, vrátane ich metylovaných derivátov. Termín "polyglutamyl-folát" sa vzťahuje na folát, ktorý má vo svojom vedľajšom reťazci aspoň dva susediace glutamylové zvyšky, zatiaľ čo termín "monoglutamyl-folát" sa vzťahuje

na folát, u ktorého podstatná časť folátových molekúl, t.j. aspoň 25 %, má len jednu glutamyllovú skupinu.

Vynález sa preto týka intracelulárnej expresie génov kódujúcich gama-glutamylhydrolázu alebo génov na biosyntézu folátu, ktoré pochádzajú zo stavovcov, rastlín, húb alebo baktérií, v mikroorganizmoch vhodných na potravinárske účely, ktorá vedie k intracelulárnej gamaglutamyl hydrolytickej aktivite. Výhodná je gama-glutamylhydroláza z krysy (Yao et al. 1996a), človeka (Yao et al. 1996b, US 5 801 031), *Arabidopsis thaliana* (Huangpu et al., 1996), zo sóje (Huangpu et al., 1996), a z gram-pozitívnych baktérií *Bacillus subtilis* (Margot et al., 1997), *Bacillus sphaericus* (Hourdou et al., 1992) a *Bacillus intermedius* (Leshchinskaya et al., 1997) a ďalej funkčne ekvivalentné hydrolázy, ktoré majú sekvenčnú identitu s týmito proteínmi aspoň 65% alebo najmenej 75%. Konkrétne je vynález založený na integrácii génu kódujúceho vyššie uvedené gama-glutamylhydrolázy do plazmidu alebo chromozómu mikroorganizmov vhodných na potravinárske účely, a to takým spôsobom, že dochádza k účinnej expresii tohto génu, či už konštitutívnej alebo po indukcii.

Vynález sa týka aj expresie génov kódujúcich gama-glutamylhydrolázy alebo gény na biosyntézu folátu, uvedených vyššie, a to takým spôsobom, že je získaný úplne alebo čiastočne funkčný enzým. Aktivita všetkých týchto enzýmov vedie k dekonjugácii derivátov polyglutamyl-folátu. Pri tejto reakcii sú z derivátov polyglutamyl-folátu enzymaticky hydrolyzované mono a/alebo polyglutamátové zvyšky, pričom vzniknú deriváty monoglutamyl-folátu alebo je folát syntetizovaný takým spôsobom, že obsahuje len jeden glutamátový zvyšok.

Vynález preto umožňuje zvýšenie celkovej produkcie folátu, špecificky derivátov monoglutamyl-folátu pochádzajúcich z derivátov polyglutamyl-folátu po expresii génu kódujúceho gama-glutamylhydrolázy, alebo je vytvorený

priamo, bez pridávania polyglutamylovej skupiny, nadprodukciou vyššie opísaných génov na biosyntézu folátu. Tým je obmedzené zadržiavanie derivátov polyglutamyl-folátu v bunke, čím dochádza k zvýšeniu aktívneho alebo pasívneho transportu monoglutamyl-folátu cez bunkovú membránu do extracelulárneho prostredia. Všeobecným výsledkom je zvýšená produkcia a biodostupnosť folátových derivátov, najmä derivátov monoglutamyl-folátu vo fermentovaných potravinách.

Ako je ukázané v nižšie uvedenom príklade 1, intracelulárna expresia a translácia gama-glutamylhydrolázy pochádzajúcej z krysy alebo človeka v baktériách mliečneho kysnutia vedie k dekonjugácii polyglutamyl-folátu na monoglutamyl-folát, k zníženiu zadržiavania intracelulárneho folátu, k zvýšeniu monoglutamyl-folátu a k zvýšeniu extracelulárneho folátu. Produkty a procesy opísané vo vynáleze tak vedú k zvýšenej dostupnosti folátu vo fermentovanej potravine. Zvýšenie dostupnosti je výsledkom dvoch javov. Po prvé, zvýšenie monoglutamyl-folátu obmedzuje potrebu aktivity prirodzených črevných hydroláz na dekonjugáciu polyglutamyl-folátov, čo je výhodné, pretože aktivita týchto črevných hydroláz je citlivá na niektoré zložky potravy. Po druhé, aktivita gama-glutamylhydroláz exprimovaných v mikroorganizmoch obmedzuje zadržiavanie folátov v bunke a tým dochádza k zvýšeniu extracelulárnej koncentrácie folátu, čo je výhodné v podmienkach, keď baktérie mliečneho kysnutia zostávajú pri prechádzaní GI traktom neporušené, takže folát nie je uvoľňovaný. Navyše, zvýšený export (monoglutamyl-)folátu z bunky povedie k zvýšeniu celkovej biosyntézy folátu z dôvodu zníženej spätnej kontroly.

Príklad 2 ukazuje účinok nadprodukcie GTP-cyklohydrolázy (EC 3.5.4.16) a 2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymetyldihydropteridínpyrofosfokinázy (EC 2.7.6.3) v *Lactococcus lactis*. U *L. lactis* gén pre *gch* kóduje bifunkčný

proteín týchto dvoch enzýmov. Výsledkom je nielen celkové zvýšenie produkcie folátu v kultúrach rekombinantných *L. lactis*, ale aj špecifické zvýšenie monoglutamyl-folátov na úkor polyglutamyl-folátov. To môže byť vysvetlené relatívne nízkou aktivitou enzýmu folylpolyglutamátsyntázy kódovanej génom *folC*, ktorá nie je dostatočne vysoká na zvládnutie vyššej rýchlosti biosyntézy folátu pri nadprodukcii GTP-cyklchydrolázy. Monoglutamyl-foláty tak môžu byť ľahšie vylučované bunkami *L. lactis*, čím dochádza nielen k obohacovaniu fermentačného média folátom, ale aj viacej jeho biodostupnou formou, ktorá je vylučovaná do média ako monoglutamylová forma.

Hoci sa príklad 1 týka gama-glutamylhydrolázy pochádzajúcej z krysy alebo človeka a kmeňa NZ9000 *Lactococcus lactis* ako baktérií mliečneho kysnutia, produkujúcich (poly/mono)glutamyl-folát, vynález všeobecne zahŕňa akékoľvek ďalšie gama-glutamylhydrolázy, najmä gama-glutamylhydrolázy vhodné na potravinárske účely. Ďalšie gama-glutamylhydrolázy, ktoré môžu byť exprimované v baktériách mliečneho kysnutia pochádzajú napríklad z *Arabidopsis*, sóje alebo *Bacillus intermedius*. Vynález zahŕňa aj expresiu uvedených gama-glutamylhydroláz v akomkoľvek inom organizme než *L. lactis* kmeňa NZ9000, ktorý je vhodný na potravinárske účely, ako sú ďalšie baktérie mliečneho kysnutia, kvasinky a huby. V príklade boli naklonované gény pre maturovanú gama-glutamylhydrolázu z krýs a ľudí za nízínový inducibilný promótor. Vynález zahŕňa aj expresiu gama-glutamylhydroláz pod kontrolou rôznych inducibilných promótorov, napríklad promótor prítomný v laktózovom operóne (Van Rooijen et al., 1990, 1992) alebo pod konštitutívnym promótorom, napríklad génu *pepN* (Tan et al., 1992).

Napriek tomu, že príklad 2 sa týka nadprodukcii GTP-cyklohydrolázy kódovanej homológym génom *gch* v *Lactococcus*

lactis, ktorá vedie k vyššie produkcii folátu, špecificky k zvýšeniu monoglutamyl-folátov verzus polyglutamyl-folátov, vynález zahŕňa aj nadprodukcii ďalších homológnych a heterológnych génov na biosyntézu folátu, napr. dhna a/alebo hppk, ale nie folP (dps), folC alebo dhfr, v *L. lactis*. Navyše vynález zahŕňa expresiu týchto génov na biosyntézu folátu v ďalších mikroorganizmoch iných než *L. lactis* kmeňa NZ9000, ktoré sú vhodné na potravinárske účely, ako sú ďalšie baktérie mliečneho kysnutia, kvasinky a huby. V príklade 2 bol gén *gch* naklonovaný na inducibilný nizínový promótor. Vynález zahŕňa aj expresiu GTP-cyklohydrolázy a prípadne ďalších enzýmov na biosyntézu folátu pod kontrolou rôznych inducibilných promótorov, napríklad promótor prítomný v laktózovom operóne (Van Rocijen et al., 1990, 1992) alebo pod konštitutívnym promótorom nachádzajúcim sa pred génom *pepN* (Tan et al., 1992).

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1 znázorňuje dráhu biosyntézy folátu. Zátvorky označujú predpokladané reakčné medziprodukty. Trifosfátové zvyšky sú znázornené ako (P)₃. Obrázok je prevzatý z Lacks et al., 1995.

Obrázok 2 znázorňuje koncentráciu kyseliny listovej v kvasničnom extrakte pri optimálnom pH, ktorá bola stanovená mikrobiologickým testom po dekonjugácii bunkovým extraktom z *L. lactis* NZ9000 indukovaného nizínom a nesúceho pNZ7001, ktorý kóduje ľudskú gama-glutamylhydrolázu alebo pNZ8048 (prázdna expresná kazeta), ktorý bol použitý ako negatívna kontrola.

Obrázok 3 znázorňuje intra- a extracelulárnu distribúciu folátu dve hodiny po indukcii nizínom u exponenciálne rastúcich buniek. Distribúcia folátu je znázornená pred

a po enzymatickej dekonjugácii ľudskou plazmou, ktorá odlišuje deriváty folátu s krátkymi zvyškami kyseliny glutámovej a s dlhými zvyškami kyseliny glutámovej ($N > 3$). PNZ8048, RgH a Hgh odpovedajú kmeňu NZ9000 *L. lactis* s plazmidom pNZ8048 (prázdna expresná kazeta), pNZ7001 (promótor nisA a maturovaný gén pre krysiu gama-glutamylhydrolázu) a pNZ7002 (promótor nisA a maturovaný gén pre ľudskú gama-glutamylhydrolázu). Koncentrácia folátu bola meraná mikrobiologickým testom.

Obrázok 4 znázorňuje nadprodukciu GTP-cyklohydrolázy detekovanú koncentráciou dihydroneopterintrifosfátu, ktorá bola analyzovaná HPLC a fluorescenciou (excitácia pri 365 nm, emisia pri 446 nm). Legenda: nebunkový extrakt z kmeňa NZ9000-pNZ7003 obsahujúceho *gch* (♦) a z kontrolného kmeňa NZ9000-pNZ8048 (∴).

Obrázok 5 znázorňuje intra- (ce) a extracelulárnu (sup) koncentráciu folátu u kmeňa NZ9000-pNZ7003 nadprodukovujúceho *gch* a u kontrolného kmeňa NZ9000-pNZ8048 (obsahujúceho prázdny plazmid pNZ8048). Koncentrácia folátu. Koncentrácia folátu bola meraná mikrobiologickým testom pred a po dekonjugácii ľudskou plazmou, ako externým zdrojom gama-glutamylhydrolázy.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Materiály a metódy

Ľudská maturovaná exopeptidáza, γ -glutamylhydroláza, bola získaná z cDNA plnej dĺžky naklonovanej vo vektore pCR2 s použitím polymerázovej reťazovej reakcie. Vektor poskytlo The Laboratory of Molecular Diagnostics, Wadsworth Center, Albany, New York. PCR produkt s dĺžkou 885 párov

báz kódujúci maturovanú ľudskú γ -glutamylhydrolázu bol získaný s použitím nasledovných primérov:

HGH-f(CATGCCATGGGACCCCCACGGCGACACCGCCAAG) a

HGH-r(GCTCTAGATCAATCAAATATGTAACATTGCTG).

Priamy primér sa predĺžil na 5' konci a bolo vytvorené reštrikčné miesto pre NcoI, ktoré umožňuje transkripčnú fúziu s indukibilným nízínovým promótorom vo vektore pNZ8048 (Kuipers et al.). S použitím uvedeného priameho priméra bol maturovaný gén nepatrne modifikovaný (nukleotidy napísané kurzívou). Reverzný primér sa predĺžil na 3' konci a bolo vytvorené reštrikčné miesto pre XbaI, ktoré umožňuje ligáciu s kohezívnymi koncami vo vektore pNZ8048. Nový vytvorený vektor, nesúci gén pre ľudskú maturovanú γ -glutamylhydrolázu, bol označený pNZ7001.

Kryšia maturovaná endopeptidáza, γ -glutamylhydroláza, sa získa z cDNA plnej dĺžky (Yao et al., 1996b) naklonovanej vo vektore pCR3 s použitím polymerázovej reťazovej reakcie. Vektor poskytlo The Laboratory of Molecular Diagnostics, Wadsworth Center, Albany, New York. PCR produkt s dĺžkou 885 párov báz kódujúci maturovanú kryšiu γ -glutamylhydrolázu bol získaný s použitím nasledovných primérov:

RGH-f(CATGCCATGGGATCCTATGAGCGCGGCTCCAAG) a

RGH-r(GCTCTAGATCAGTTAAACATATAAGCTTGCTG).

Priamy primér sa predĺžil na 5' konci a bolo vytvorené reštrikčné miesto pre NcoI, ktoré umožňuje transkripčnú fúziu s indukibilným nízínovým NIS promótorom vo vektore pNZ8048. S použitím uvedeného priameho priméra bol maturovaný gén nepatrne modifikovaný (nukleotidy napísané kurzívou). PCR produkt so zatupenými koncami bol naklonovaný do vektora PCR blunt (Invitrogén) a bol natransformovaný do *Escherichia coli*. Bol vyizolovaný čiastočne naštiepený fragment NcoI-KpnI a bol zaligovaný do

pNZ8048. Nový vytvorený vektor, nesúci gén pre krysiu maturovanú γ -glutamylhydrolázu, bol označený pNZ7002.

Vektor nesúci gén pre maturovanú krysiu alebo ľudskú γ -glutamylhydrolázu bol transformovaný elektroporáciou do kmeňa NZ9000 *Lactococcus lactis*, ktorý nesie v chromozóme gény nisR a nisK. Expresia génu pre maturovanú krysiu alebo ľudskú γ -glutamylhydrolázu bola dosiahnutá podľa protokolu k NICE systému (nizínom indukovaná, kontrolovaná expresia) (De Ruyter et al., 1996). Na expresiu a transláciu génu pre maturovanú krysiu alebo ľudskú γ -glutamylhydrolázu boli použité koncentrácie nizínu v rozmedzí od 0,1 do 5 ng/ml. Western blot analýza bola uskutočnená len pre ľudskú γ -glutamylhydrolázu, s použitím polyklonálnej protilátky, ktorú poskytlo The Laboratory of Molecular Diagnostics, Wadsworth Center, Albany, New York, USA.

Aktivita enzýmu maturovanej krysej alebo ľudskej γ -glutamylhydrolázy bola stanovená rastom kmeňa NZ9000 *L. lactis* nesúceho pNZ7001 alebo pNZ7002 v 5 ml M17 (Terzaghi a Sandine, 1975), doplneného 0,5% (hm/obj) glukózy (GM17) a 10 μ g/ml chloramfenikolu, až kým OD600 nebolo 0,5. Pri OD600 = 0,5 bol pridaný nizín (1,0 ng/ml), aby bola indukovaná expresia génu pre maturovanú krysiu alebo ľudskú γ -glutamylhydrolázu. Po dvoch hodinách rastu bol vyrobený 20-krát koncentrovaný bunkový extrakt (1 ml 0,1 M merkaptoetanol, 0,1 M NaPO₄ pufer, pH 7,0), s použitím kremenných guľičiek a drtiča buniek FP120 fastprep™ (Savant Instruments inc. Holbrook, NY, USA). 500 μ l koncentrovaného bunkového extraktu bolo pridaných do roztoku kvasničného extraktu (kvasničný extrakt 0,5 g/l, /Difco Laboratories, Detroit, USA/ v 20 ml 0,1 M NaPO₄ pufru, pH 7,0, 1% kyseliny askorbovej) ako zdroja derivátov polyglutamyl-folátu. Inkubácia pokračovala štyri hodiny pri 37 °C a pravidelne boli odoberané vzorky. Reakcia bola

zastavená ohriatím vzoriek na 100 °C počas 10 minút. Koncentrácia folátu bola stanovená pomocou mikrobiologického testu s *Lactobacillus casei*, opísaného v Horne a Patterson (1988). V pokusoch bol ako negatívna kontrola použitý kmeň NZ9000 transformovaný s pNZ8048 (prázdna nizínová expresná kazeta).

Aktivita enzýmu maturovanej krysej alebo ľudskej γ -glutamylhydrolázy v rastúcich baktériách mliečneho kysnutia bola stanovená rastom kmeňa NZ9000 *L. lactis* nesúceho pNZ7001 alebo pNZ7002 v M17 (Terzaghi a Sandine, 1975), doplneného 0,5% (hm/obj) glukózy (GM17) a 10 μ g/ml chloramfenikolu. Pri OD600 = 0,5 bol pridaný nizín (1,0 ng/ml) a z rastúcej kultúry boli periodicky odoberané vzorky. Vzorky boli centrifugované až do oddelenia buniek od supernatanta. Supernatant bol zriedený na 1:1 s 0,1 M NaAc pufrum pH 4,8, 1% kyselinou askorbovou. Bunky boli opláchnuté v 0,1 M NaAc pH 4,8, 1% kyseliny askorbovej a boli resuspendované v pôvodnom objeme 0,1 M NaAc pufru pH 4,8, 1% kyseliny askorbovej. Všetky vzorky boli ohriate na 100 °C počas 10 minút, potom bola stanovená koncentrácia folátu pomocou mikrobiologického testu s *Lactobacillus casei*, opísaného v Horne a Patterson (1988). Prítomnosť polyglutamyl-folátu bola analyzovaná inkubáciou vzoriek počas štyroch hodín, pri 37 °C, s ľudskou plazmou (Sigma-Aldrich Chemie, Zwijndrecht, NL), ako zdrojom γ -glutamylhydrolázy, následne bola stanovená koncentrácia folátu.

Výsledky

Pridanie 1,0 ng/ml nizínu viedlo k expresii génu pre ľudskú γ -glutamylhydrolázu, čo bolo detekované na western blote s použitím polyklonálnej protilátky. Krysia γ -glutamylhydroláza nemôže byť detekovaná na western blote, pretože nie je k dispozícii špecifická protilátka.

Expresia funkčnej ľudskej gama-glutamylhydrolázy sledovaná *in vitro*

Mikrobiologický test na prítomnosť folátu detekuje hlavne deriváty folátu s tromi alebo menej glutamátovými zvyškami. Rastová odpoveď detekčných mikroorganizmov na dlhšie folátové reťazce ($n > 3$) je značne znižovaná v závislosti od dĺžky reťazca (Tamura et al., 1972). Výsledkom je, že v zdroji obsahujúcom polyglutamyl-foláty s viac ako tromi glutamyllovými zvyškami, ako je napríklad kvasničný extrakt, ktorý obsahuje prevažne heptaglutamyl-foláty (Bassett et al., 1976), môže byť folát detekovaný mikrobiologickým testom až po odstránení polyglutamyllových reťazcov. Z tohto dôvodu bol na testovanie expresie funkčnej ľudskej γ -glutamylhydrolázy v *Lactococcus lactis* použitý kvasničný extrakt. Pridanie bunkového extraktu z *L. lactis* NZ9000, ktorý nesie pNZ7001 alebo pNZ7002 indukovaný nizínom, viedlo k dekonjugácii polyglutamyl-folátu, čo bolo detekované mikrobiologickým testom. Pridaním bunkového extraktu z *L. lactis* NZ9000 nesúceho pNZ8048 (prázdna nizínová expresná kazeta), dekonjugačná aktivita nebola prejavovaná (obrázok 2).

Intracelulárna expresia gama-glutamylhydrolázy sledovaná *in vivo*

Kmeň NZ9000 nesúci pNZ7001 alebo pNZ7002 alebo pNZ8048 (prázdna nizínová expresná kazeta) vykazoval identické rastové charakteristiky. Indukcia nizínom pri $OD_{600} = 0,5$ neovplyvňuje rýchlosť rastu. Po indukcii nizínom bola meraná koncentrácia folátu v supernatante a bunkových extraktoch týchto kmeňov. Pre kmene *L. lactis* NZ9000 nesúce pNZ7001 alebo pNZ7002 bolo charakteristické zvýšenie extracelulárnej koncentrácie folátu počas rastu. Extracelulárna koncentrácia folátu u kmeňa *L. lactis* NZ9000 nesúceho pNZ8048 zostala počas rastu konštantná.

Intracelulárna koncentrácia folátu u kmeňov exprimujúcich γ -glutamylhydrolázu sa v priebehu rastu nezvyšovala, na rozdiel od zvyšujúcej sa koncentrácie folátu u kontrolného kmeňa. Obrázok 3 znázorňuje intra- a extracelulárnu distribúciu folátu dve hodiny po indukcii nizínom. Kmeň NZ9000-pNZ7002 mal najväčšiu extracelulárnu koncentráciu folátu, pravdepodobne vďaka endopeptidázovej aktivite krysej γ -glutamylhydrolázy, ktorá okamžite redukuje polyglutamyl-foláty na monoglutamyl-foláty. Exopeptidázová aktivita ľudskej γ -glutamylhydrolázy redukuje polyglutamyl-folát cez kratšie polyglutamyl-foláty na monoglutamyl-foláty. Bunkové extrakty boli kontrolované aj na prítomnosť intracelulárne uloženého polyglutamyl-folátu. Hladiny folátu boli stanovené mikrobiologickým testom po inkubácii s ľudskou plazmou ako zdrojom γ -glutamylhydrolázy. Kmene NZ9000-pNZ7001 a pNZ7002 neobsahovali polyglutamyl-folát a koncentrácia folátu sa v priebehu rastu nemenila. Intracelulárna koncentrácia folátu u kmeňa NZ9000-pNZ8048 v sebe čiastočne zahŕňa polyglutamyl-foláty, pozri obrázok 3. Nárast extracelulárnej koncentrácie folátu vo fermentačnom médiu u kmeňov po dekonjugácii bol obvykle spôsobený prítomnosťou polyglutamyl-folátu z kvasničného extraktu, ktorý je súčasťou bakteriálneho rastového média GM17. Na základe výsledkov možno teda konštatovať, že enzymatická aktivita exprimovaných γ -glutamylhydroláz viedla k dekonjugácii intracelulárneho polyglutamyl-folátu a výsledkom bolo znížené zadržiavanie folátových derivátov v bunke, čo vedie k zvýšeniu extracelulárnej koncentrácie folátu.

Informácie o sekvenciách DNA pre gény kódujúce ľudskú a krysiu γ -glutamylhydrolázu pozri v referenciách Yao et al., 1996a a b.

Príklad 2

Materiály a metódy

Gén *gch* kódujúci GTP-cyklohydrolázu bol identifikovaný pomocou analýzy sekvencií a porovnaním homológie časti genómu *L. lactis* kmeňa MG1363 ohraničenej génmi *dhfr* kódujúcim dihydrofolátreduktázu a *dhom* kódujúcim homoserín-dehydrogenázu s databázami obsahujúcimi neredundantné genómy. Sekvencia bola získaná amplifikáciou genómového úseku s použitím primérov *dhfrF*(GGAAT TCCAT GGTTA TTGGA ATATG GGCAG AAG) a *dhomR*(CGATC CCGGG AAGCC CTGTG CCACT GTCCA A). Priméry boli odvodené na základe informácií o sekvenciách získaných v GenBank pod prístupovými číslami X60681, resp. X96988. Výsledky porovnania homológií naznačujú, že časť amplifikovaného fragmentu (celková dĺžka približne 8 kb) obsahuje sekvenčnú informáciu pre GTP-cyklohydrolázu a 2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymetyldihydropteridínpyrofosfokinázu. PCR produkt získaný pomocou primérov *hpk-f2*(CATGC CATGG GGCAA ACAAC TTATT TAAGC ATGGG) a *gch-r3*(GGGGT ACCGA TTCTT GATTA AGTTC TAAG), ktorý obsahuje potenciály štart kodón 2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymetyldihydropteridínpyrofosfokinázy a potenciálny stop kodón GTP-cyklohydrolázy bol naklonovaný do reštrikčných miest *NcoI* a *KpnI* v pNZ8084 (Kuipers et al.), pričom vznikol plazmid pNZ7003. Priamy primér sa predĺžil na 5' konc, aby vzniklo reštrikčné miesto pre *NcoI* umožňujúce translačnú fúziu s inducibilným nízovým promótorom vo vektore pNZ8048. Použitie uvedeného priameho priméra viedlo k miernej modifikácii pôvodného génu *gch*; za Met-1 bol včlenený glycín, aby sa nezmenila nasledujúca kyselina. Reverzný primér sa predĺžil na 3' konci, aby vzniklo reštrikčné miesto pre *KpnI* umožňujúce ligáciu s kohezívnymi koncami vo vektore pNZ8048. Vektor bol vnesený elektroporáciou do kmeňa NZ9000 *L. lactis* (De Ruyter et

al., 1996), pričom vznikol kmeň NZ9000-pNZ7003 *L. lactis*. Kmeň NZ9000 exprimoval regulačné gény *nisRK*, ktoré sú stabilne integrované do *pepN* lokusu.

Expresia *gch* bola regulovaná nížinovým promótorom pridaním nížinu do fermentačného média (De Ruyter et al., 1996). Reštrikčné štiepenie, ligácia a transformácia budú uskutočnené podľa štandardných protokolov opísaných v Sambrook et al.

Stanovenie enzymatickej aktivity GTP-cyklohydrolázy

Na zistenie, či je GTP-cyklohydroláza v *L. lactis* aktívne exprimovaná, bol uskutočnený enzymatický test. Nebunkový extrakt z NZ9000-pNZ7003 bol použitý ako zdroj enzýmu a komerčne dostupné GTP bolo použité ako substrát. Upravený protokol, pôvodne opísaný v Saizieu et al. (1995), bol použitý na testovanie aktivity GTP-cyklohydrolázy. Kmeň NZ9000 *L. lactis* nesúci pNZ7003 sa nechal rásť v médiu M17 (Terzaghi a Sandine, 1975) doplnenom 0,5% (hm/obj) glukózy (GM17) a 10 µg/ml chloramfenikolu. Pri OD600 = 0,5 bol pridaný nížin (2,0 ng/ml). Pri OD600 = 2,5 boli zobrať bunky z 25 ml kultúry a rozmiešané v 1,0 ml 0,1 M pufru fosforečnanu sodného, pH 6,5. Intracelulárny obsah bol uvoľnený s použitím kremenných guľičiek a drtiča buniek FP120 fastprep™ (Savant Instruments inc. Holbrook, NY, USA). Aktivita GTP-cyklohydrolázy bola stanovená pri 30 °C v 100 mM-tris/HCl pH 8, 100 mM KCl, 1 mM EDTA pH 8, 50 iM GTP a 2% nebunkovom extrakte. Postupne odoberané vzorky boli ohriate na 100 °C počas 10 minút, aby bol enzým inaktivovaný. Spotreba GTP a tvorba produktu bola analyzovaná pomocou HPLC. Vzorky (25 µl) boli aplikované na kolónu 8 µ 1000 Å PL-SAX (Polymer Laboratories) pri prietoku 1,2 ml/min s bežiacim pufrom, ktorý obsahoval 50 mM fosfát, 100 mM NaCl, pH 6,5. Spotreba GTP bola sledovaná pomocou UV absorpcie pri 245 nm, reakčný produkt bol

detekovaný fluorometricky; excitácia pri 365 nm, emisia pri 446 nm (pozri obrázok 4).

Nadprodukcia *gch*

Účinok nadprodukcie *gch* kódujúceho GTP-cyklohydrolázu a 2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymetyldihydropteridínpyrofosfokinázy na produkciu folátu v rastúcich baktériách mliečneho kysnutia bol stanovený rastom *Lactococcus lactis* kmeňa NZ9000 nesúceho pNZ7003 v médiu M17 (Terzaghi a Sandine, 1975) doplnenom 0,5% (hm/obj) glukózy (GM17) a 10 µg/ml chloramfenikolu. Pri OD600 = 0,5 bol pridaný nizín (2,0 ng/ml). Pri OD600 = 2,5 bola bunková kultúra centrifugovaná až do oddelenia buniek od supernatanta. Supernatant bol zriedený na 1:1 s 0,1 M NaAc pufrom pH 4,8, 1% kyselinou askorbovou. Bunky boli opláchnuté v 0,1 M NaAc pH 4,8, 1% kyseliny askorbovej a boli resuspendované v pôvodnom objeme 0,1 M NaAc pufru pH 4,8, 1% kyseliny askorbovej. Vzorky boli ohriate na 100 °C počas 10 minút, potom bola stanovená koncentrácia folátu pomocou mikrobiologického testu s *Lactobacillus casei*, opísaného v Horne a Patterson (1988). Prítomnosť polyglutamyl-folátu bola analyzovaná inkubáciou vzoriek počas štyroch hodín, pri 37 °C, s ľudskou plazmou (Sigma-Aldrich Chemie, Zwijndrecht, NL), ako zdrojom γ -glutamylhydrolázy, následne bola stanovená koncentrácia folátu pomocou mikrobiologického testu s *Lactobacillus casei*.

Výsledky

Testom pre enzymatickú aktivitu GTP-cyklohydrolázy bolo preukázané zvýšenie reakčného produktu v čase po pridaní GTP (obrázok 4). Tento reakčný produkt mal obdobné chromatografické vlastnosti, aké boli opísané predtým (retenčný čas 9,52 min) [Saizieu et al., (1995)] a bol stotožnený s dihydroneopterin-trifosfátom, hlavným

produktom GTP-cyklohydrolázy. Reakčná zmes obsahovala nadbytok GTP. Pokles koncentrácie GTP a nárast dihydroneopterin-trifosfátu bol nameraný len v nebunkovom extrakte z NZ9000-pNZ7003. Kontrolná reakcia obsahujúca nebunkové extrakty z kmeňa NZ9000-pNZ7003 nevykazovala signifikantné zníženie GTP, ani tvorbu produktov promeny GTP.

Kvalitatívnou SDS-PAGE proteínovou analýzou bunkového extraktu NZ9000-pNZ7003 indukovaného nizínom bola preukázaná nadprodukcia proteínu s veľkosťou 40 kDa v porovnaní s kontrolným kmeňom a NZ9000-pNZ8048.

Rastúce bunky kmeňa NZ9000-pNZ7003 po indukcii nizínom vykazovali nárast intra- a extracelulárnej koncentrácie folátu v porovnaní s kontrolným kmeňom a NZ9000-pNZ8048 (obrázok 5). Celková produkcia folátu bola dvojnásobná. Väčšina z nadprodukovaneho folátu bola prítomná v rastovom médiu; koncentrácia extracelulárneho folátu vzrástla v porovnaní s kontrolným kmeňom približne dvadsaťnásobne. Nárast intracelulárnej koncentrácie folátu bol menej významný. Dekonjugáciu intracelulárnych zásob folátu bolo preukázané, že len v kontrolnom kmeni je intracelulárna koncentrácia folátu čiastočne prítomná vo forme polyglutamyl-folátu. Kmeň nadprodukuje GTP-cyklohydrolázu neprodukoval folát vo forme polyglutamyl-folátu ani vnútri buniek, ani mimo buniek.

Priemyselná využiteľnosť

Je poskytnutý postup na zvýšenie produkcie folátu, špecificky biodostupného folátu, t.j. folátu, ktorý je ľahko vstrebateľný cicavčím gastrointestinálnym traktom, a to s použitím geneticky modifikovaných mikroorganizmov vhodných na potravinárske účely. Ďalej sú poskytnuté aj potraviny, predovšetkým mliečne výrobky, ako sú jogurty a ďalšie fermentované potraviny, ktoré obsahujú

mikroorganismy produkující velké množství biodostupného folátu.

Referencie

De Saizieu, A., Vankan, P. a Van Loon, A.P.G.M. (1995) Enzymic Characterization of *Bacillus subtilis* GTP Cyclohydrolase I. *Journal of Biochemistry* 306: 371-377.

Gregory J.F. Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability and bioavailability of dietary folates. *Adv. Food Nutr. Res.* 1989; 33: 1-101.

Horne, D.W., Patterson, D. *Lactobacillus casei* microbiological assay of folic acid derivates in 96 well microtiter plates. *Clin. Chem.* 34, 2357-2359 (1988).

Huangpu, J., Pak, J.H., Graham, M.C., Rickle, S.A., Graham, J.S. Purification and molecular analysis of an extracellular gamma-glutamyl hydrolase present in young tissues of the soybean plant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226, 1-6 (1996).

Kuipers, O.P., de Ruyter P., Kleerebezem M., a de Vos W. Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. 1998; 64: 15-21.

Lacks, S.A., Greenberg, B., a Lopez, P. (1995) A Cluster of Four Genes Encoding Enzymes for Five Steps in the Folate Biosynthetic Pathway of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriologie*, 66-74.

Leshchinskaya, I.B., Shakirov, E.V., Itskovitch, E.L., Balaban, N.P., Mardano, A.M., Sharipova, M.R., Blagova, E.V., Levnikov, V.M., Kuranova. I.P., Rudenskaya, G.N., a Stepanov, V.M. (1997) Glutamyl endopeptidase of *Bacillus*

intermedius strain 3-19. Purification, properties and crystallization. *Biochemistry (Mosc)* 62: 903-908.

Rooijen, R.J. van, Gasson, M.J., de Vos, W.M. Characterization of the *Lactococcus lactis* lactose operon promoter: contribution of flanking sequences and LacR repressor to promoter activity. *J. Bacteriol.* 174(7), 2273-2280 (1992).

Rooijen, R.J. van, de Vos, W.M. Molecular cloning, transcriptional analysis and nucleotide sequence of *lacR*, a gene encoding the repressor of the lactose phosphotransferase system of *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* 265(30), 18499-18503 (1990).

Rosenberg, I.H., Godwin, H.A. Inhibition of intestinal gamma-glutamyl carboxypeptidase by yeast nucleic acid: an explanation of variability in utilization of dietary polyglutamyl folate. *J. Clin. Investig.* 1971.

Ruyter, P.G. de, Kuipers, O.P., de Vos W.M. Controlled gene expression for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996 Oct; 62(10): 3662-3667.

Seyoum, E., Selhub, J. Properties of food folates determined by stability and susceptibility to intestinal pteroylpolyglutamate hydrolase action. *J. Nutr.* 1998 Nov; 128(11): 1956-1960.

Shane, B. Folylpolyglutamate synthesis and role in the regulation of one-carbon metabolism. *Vitam. Horm.* 1989; 45: 263-335.

Tan, P.S., van Aalen-Boerrigter, I.J., Poolman, B., Siezen, R.J., de Vos, W.M., Konings, W.N. Characterization of the *Lactococcus lactis* pepN gene encoding an aminopeptidase homologous to mammalian aminopeptidase N. FEBS Lett. 1992 Jul 13; 306(1): 9-16.

Terzaghi, B.E. and Sandine, W.E. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1975; 38: 17-22.

Yao, R., Schneider, E., Ryan, T.J., Galivan, J. Human gamma-glutamyl hydrolase: cloning and characterization of the enzyme expressed in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996a Sep 17; 93(19): 1134-1138.

Yao, R., Nimec, Z., Ryan, T.J., Galivan, J. Identification, cloning and sequencing of a cDNA coding for rat gamma-glutamyl hydrolase. J. Biol. Chem. 1996b Apr 12; 271(15): 8525-8528.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Geneticky modifikovaný mikroorganizmus vhodný na potravinárske účely, u ktorého modifikácia vedie k zvýšeniu produkovaného množstva monoglutamyl-folátu, vzhľadom na množstvo produkované nemodifikovaným organizmom.

2. Geneticky modifikovaný mikroorganizmus vhodný na potravinárske účely podľa predchádzajúceho nároku 1, u ktorého je zvýšená aktivita aspoň jedného enzýmu zúčastňujúceho sa syntézy monoglutamyl-folátu.

3. Geneticky modifikovaný mikroorganizmus vhodný na potravinárske účely podľa predchádzajúceho nároku 2, u ktorého uvedený enzým zahŕňa GTP-cyklohydrolázu kódovanú génom *gch*.

4. Geneticky modifikovaný mikroorganizmus vhodný na potravinárske účely podľa predchádzajúceho nároku 1, u ktorého je zvýšená aktivita gama-glutamylhydrolázy.

5. Geneticky modifikovaný mikroorganizmus vhodný na potravinárske účely podľa predchádzajúceho nároku 2 alebo 3, u ktorého je zvýšená aktivita uvedeného enzýmu výsledkom prítomnosti mnohých kópií príslušných génov.

6. Geneticky modifikovaný mikroorganizmus vhodný na potravinárske účely podľa predchádzajúceho nároku 2 alebo 3, u ktorého je zvýšená aktivita uvedeného enzýmu výsledkom prítomnosti promotora zvyšujúceho expresiu príslušných génov.

7. Geneticky modifikovaný mikroorganizmus vhodný na potravinárske účely podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov 1 až 6, u ktorého sú gény kódujúce uvedené

enzymatické aktivity živočíšneho, predovšetkým cicavčieho pôvodu.

8. Geneticky modifikovaný mikroorganizmus vhodný na potravinárske účely podľa ktoréhokolvek z predchádzajúcich nárokov 1 až 6, u ktorého sú gény kódujúce uvedené enzymatické aktivity rastlinného pôvodu.

9. Geneticky modifikovaný mikroorganizmus vhodný na potravinárske účely podľa ktoréhokolvek z predchádzajúcich nárokov 1 až 6, u ktorého sú gény kódujúce uvedené enzymatické aktivity mikrobiálneho pôvodu z organizmov vhodných na potravinárske účely, najmä z baktérie mliečneho kysnutia alebo kvasinky.

10. Geneticky modifikovaný mikroorganizmus vhodný na potravinárske účely podľa ktoréhokolvek z predchádzajúcich nárokov 1 až 9, ktorý je baktériou mliečneho kysnutia.

11. Spôsob produkcie monoglutamyl-folátu, **vyznačujúci sa tým**, že sa kultivuje geneticky modifikovaný mikroorganizmus vhodný na potravinárske účely podľa ktoréhokolvek z predchádzajúcich nárokov 1 až 10 a že sa získajú produkované foláty.

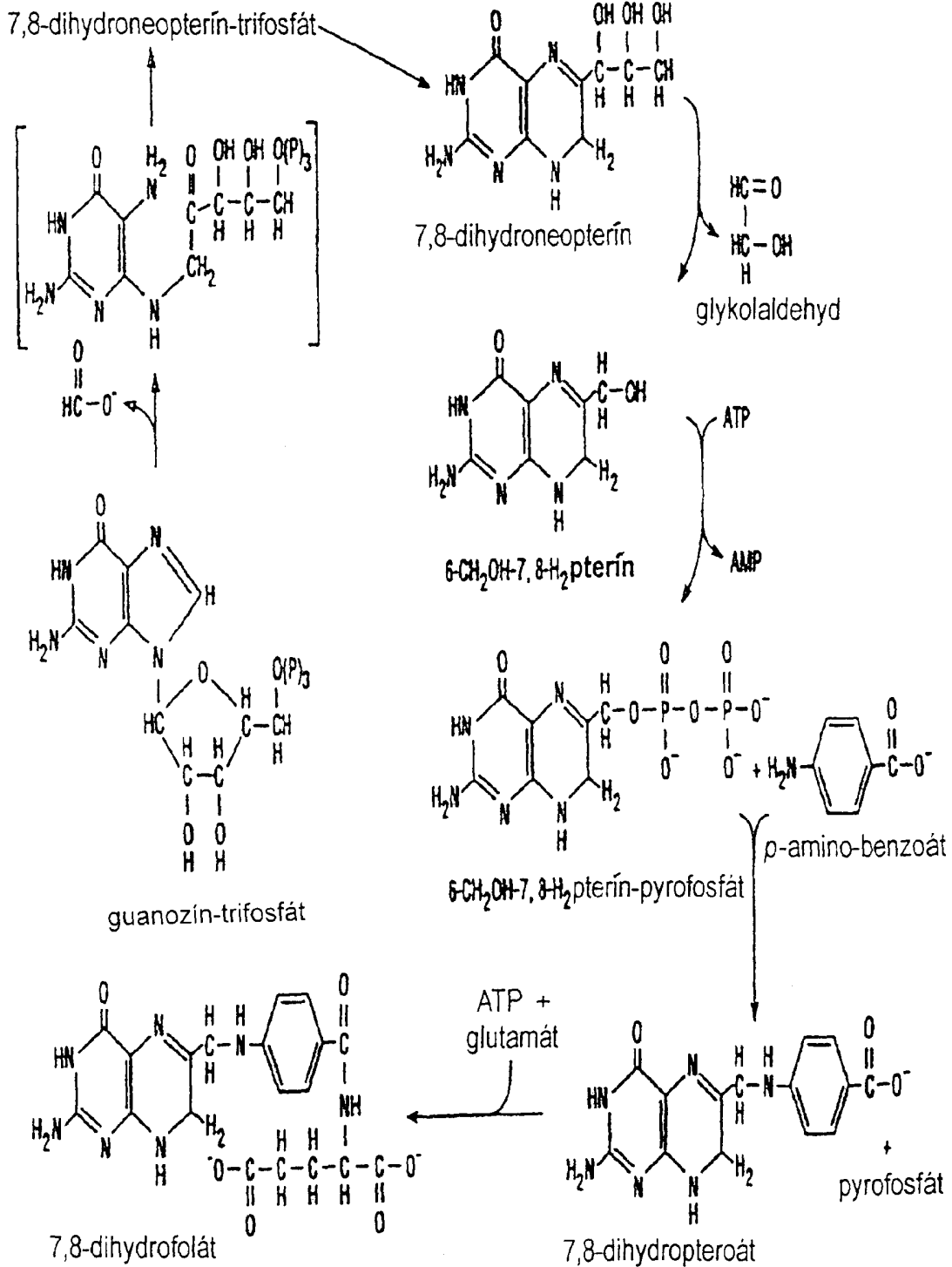
12. Spôsob poskytovania biodostupného folátu pre cicavčí gastrointestinálny trakt, **vyznačujúci sa tým**, že sa podáva účinné množstvo geneticky modifikovaného mikroorganizmu, vhodného na potravinárske účely podľa ktoréhokolvek z predchádzajúcich nárokov 1 až 10.

13. Potravinový produkt, **vyznačujúci sa tým**, že obsahuje geneticky modifikovaný mikroorganizmus vhodný na

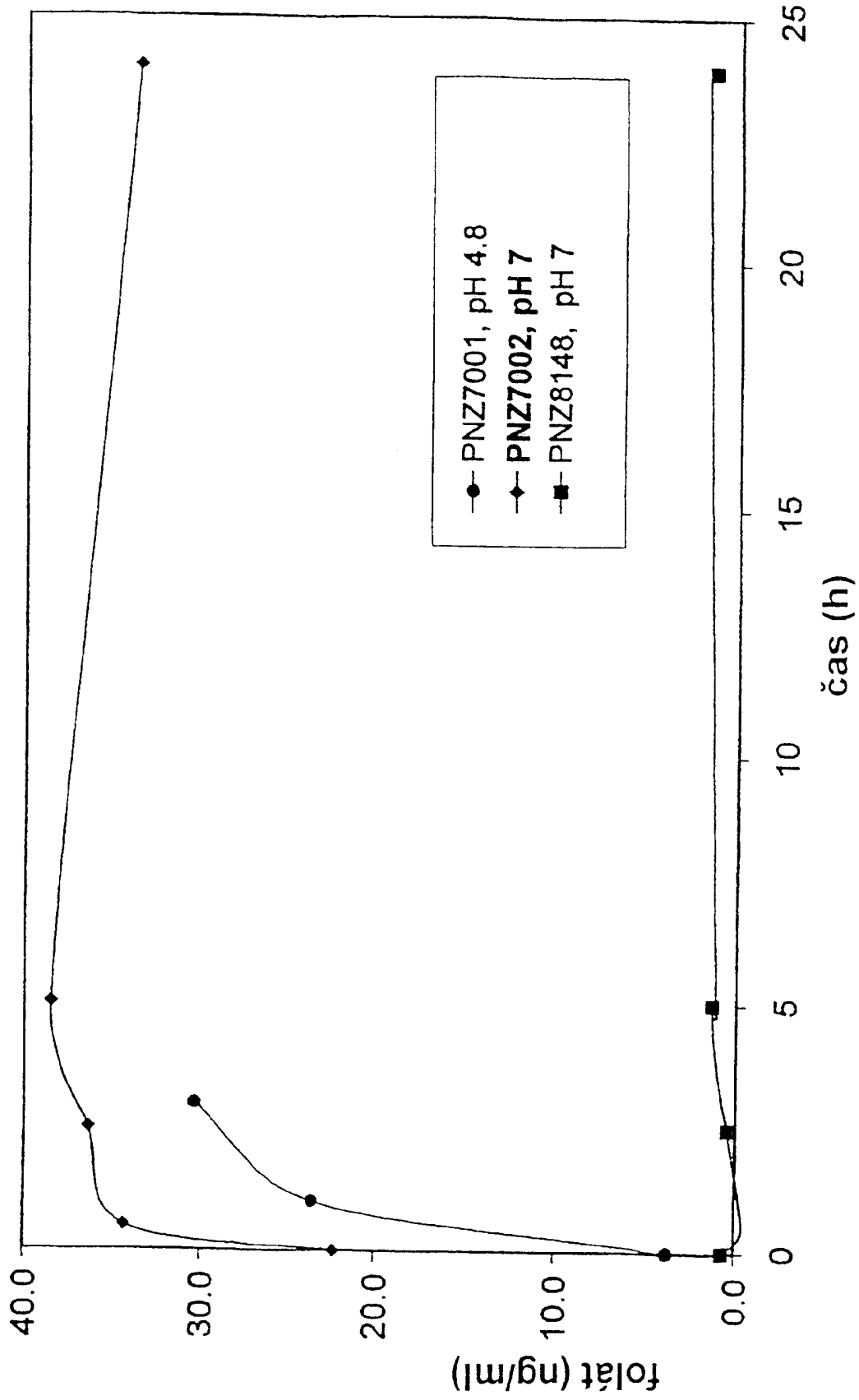
potravinárske účely podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov 1 až 10.

14. Potravinový produkt podľa predchádzajúceho nároku 13, **vyznačujúci sa tým**, že ide o mliečny produkt.

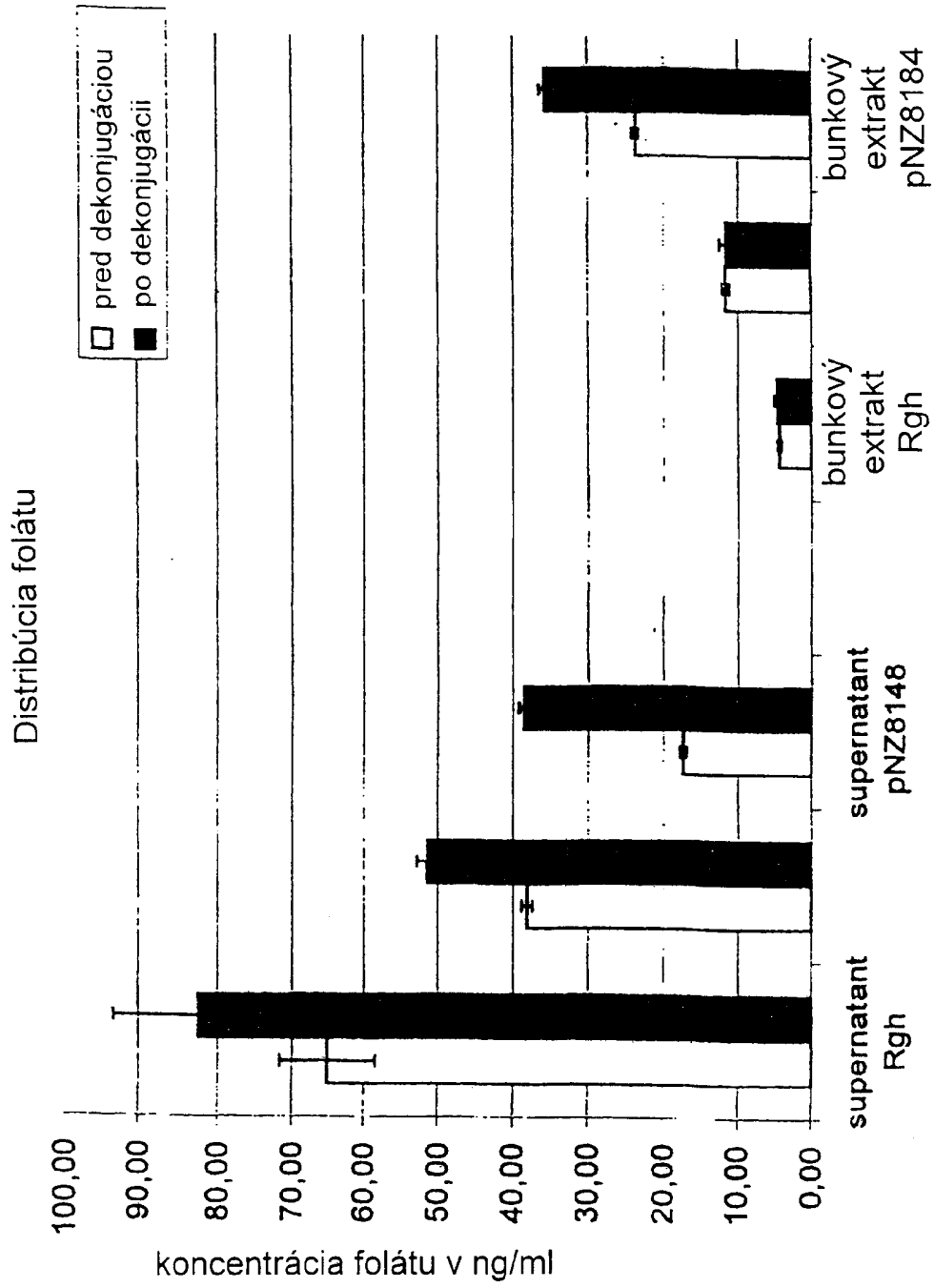
Obrázok 1



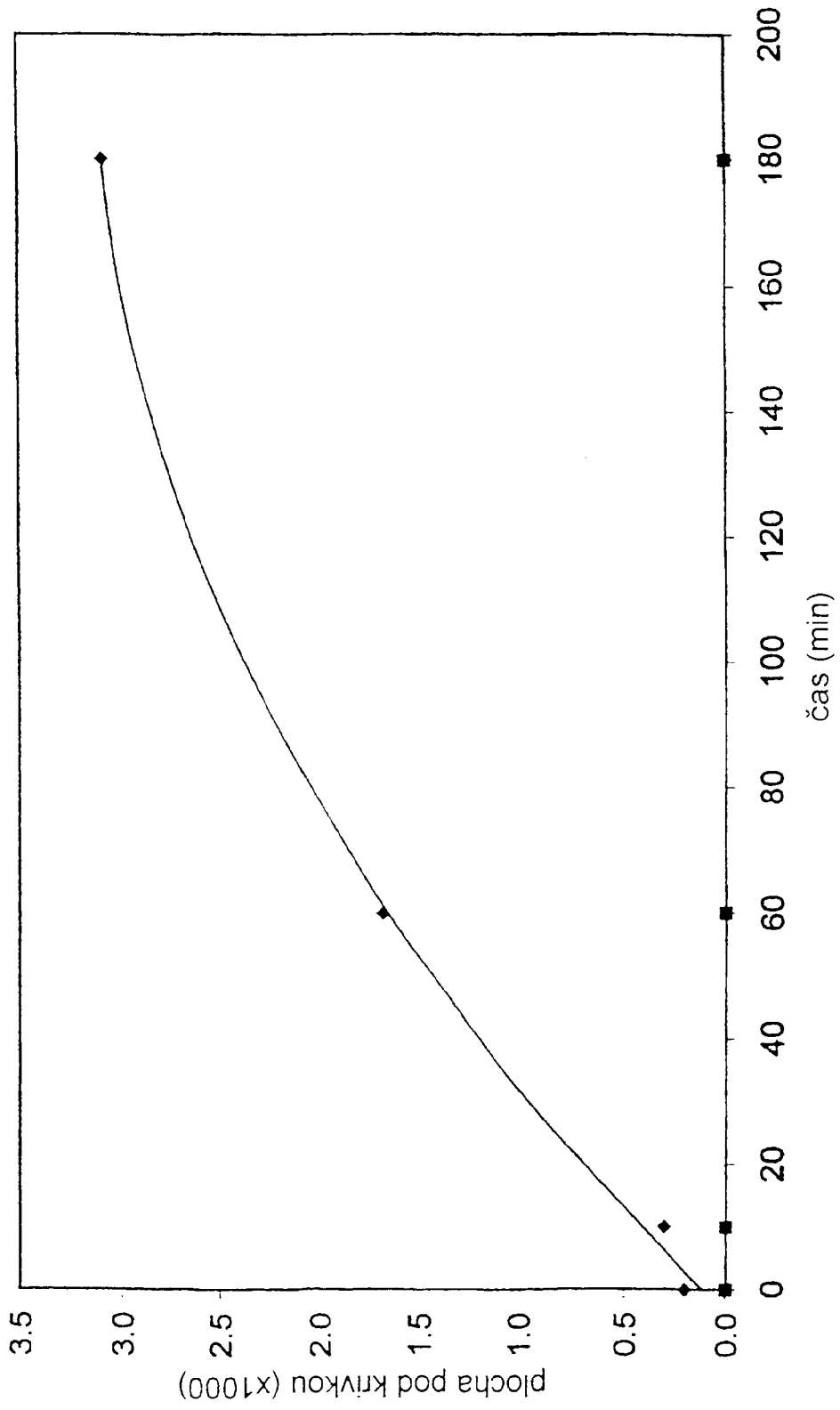
Obrázok 2



Obrázok 3



Obrázok 4



Obrázok 5

