

HALOGÉNVEGYÜLETEKSEL SZEMBEN TOLERÁNS ÚJ FORMIÁT-DEHIDROGENÁZ ÉS ELJÁRÁS ANNAK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

K i v o n a t

5

A találmány formiát-dehidrogenázra vonatkozik, amely nagy specifikus aktivitással, formiátra és NAD-ra kis Km értékekkel, széles hőstabilitással és pH-stabilitással rendelkezik, széles hőmérséklet- és pH-tartományban működőképes, és jó hatékonysággal képes egy koenzimet regenerálni, ha egy enzimatikus redukciós reakciórendszerben jelen van, anélkül, hogy inaktiválódna.

10

Az ipari alkalmazásra megfelelő jellemzőkkel rendelkező fenti enzimet formiát-dehidrogenázt termelő talajbaktériumok szűrésével választották ki. A találmány tárgyát képezi továbbá a találmány szerinti enzimet kódoló gént tartalmazó DNS, egy vektor alkalmazásával szerkesztett rekombináns DNS, és a fenti plazmid alkalmazásával előállított transzformáns. A találmány tárgya továbbá eljárás a találmány szerinti formiát-dehidrogenáz előállítására, a *Thiobacillus* génuszba tartozó mikroorganizmus vagy annak transzformánusa alkalmazásával, amelyet a fent említett mikroorganizmus törzsből származó formiát-dehidrogenáz gén alkalmazásával szerkesztenek meg, és eljárás egy koenzim regenerálására a fenti enzim alkalmazásával egy enzimatikus redukciós rendszerben.

15

20



25

100288-9285SI

HALOGÉNVEGYÜLETEKSEL SZEMBEN TOLERÁNS ÚJ
5 FORMIÁT-DEHIDROGENÁZ ÉS ELJÁRÁS ANNAK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

A találmány tárgyát halogénketon vegyületekkel szemben toleráns és formiát-dehidrogenáz aktivitással rendelkező polipeptid, az ezt kódoló gén, eljárás formiát-dehidrogenáz előállítására a fenti peptidet termelő mikroorganizmus
 10 vagy annak valamely transformánsa segítségével, és eljárás egy koenzim regenerálására nagy hatékonysággal, amely megendegi a fenti enzim jelenlétét egy enzimatiszikus redukciós reakciórendszerben.

A találmány hátterét az alábbiakban ismertetjük.

A formiát-dehidrogenáz enzim (EC1.2.1.2 számú enzim) egy olyan enzim,
 15 amely formiátból és oxidált nikotinamid-adenin-dinukleotidból (továbbiakban: NAD) szén-dioxidot és redukált nikotinamid-adenin-dinukleotidot (továbbiakban: NADH) eredményező reakciót katalizál. A formiát-dehidrogenáz egy hasznos enzim, amelynek az az előnye, hogy ha egy NADH-dependens enzimatiszikus reakcióban a koenzim regenerálására alkalmazzák, egy olcsó formiát
 20 alkalmazható és melléktermékként szén-dioxid keletkezik, amely nem halmozódik fel a rendszerben. Ezenkívül, mivel ennek az enzimnek Km értékei formiátra és NAD-ra alacsonyak, ez az enzim kis szubsztrát koncentrációknál is hatékonyan működik, és a formiát specifikus mikrovizsgálatára alkalmazható, ezért iparilag használható enzim.

25 Ismeretes, hogy a formiát-dehidrogenáz magasabbrendű növényekben, metanolt hasznosító élesztőkben, baktériumokban és hasonlóokban fordul elő. Az eddig tiszta formában előállított és jellemzett enzimek közé tartoznak a borsóból mint magasabbrendű növényből [*Pisum sativum*: J. Biochem. 77, 845 (1975)] és a metanolt hasznosító élesztőfajokból, mégpedig a *Candida boidinii*-ből [Eur. J. Biochem. 62, 151 (1976)], *Candida methylica*-ből [Eur. J.

30

Biochem. 152, 657 (1985)], *Candida methanolica*-ból (FEMS Microbiol. Lett. 48, 139 (1987)], *Kloeckera sp.*-ből (Agric. Biol. Chem. 38, 111 (1974)], *Pichia pastoris*-ből [Agric. Biol. Chem. 47, 2547 (1983)] és *Lipomyces methanosilviensis*-ből (JP-A-60-241887) származó enzimek többek között.

5 Azonban ezek az enzimek mind mutatnak olyan hiányosságokat, amelyek miatt ipari felhasználásra nem alkalmasak, mégpedig alacsony a specifikus aktivitásuk, Km értékük nagy formiátra és NAD-ra és/vagy szűk pH-tartományban aktívak.

10 Ismeretes néhány baktériumokból tisztított és jellemzett enzim is, azonban ezek is mind rendelkeznek bizonyos hátrányokkal ipari alkalmazás szempontjából. Például a *Pseudomonas sp. 101*-ből származó enzimek [Eur. J. Biochem. 99, 569 (1979)] és a *Pseudomonas oxalaticus*-ből származó enzimek [Eur. J. Biochem. 83, 485 (1978)] viszonylag magas specifikus aktivitással rendelkeznek, azonban stabilizálószer nélkül instabilak. A *Moraxella sp.*-ből
15 származó enzim [J. Bacteriol. 170, 3189 (1988); JP-A-63--313580] specifikus aktivitása alacsony, és nagy Km értékkel rendelkezik formiátra. A *Hyphomicrobium sp.*-ből származó enzim (JP-A-2000-78970, Congress of Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry (1999), a kongresszuson felolvasott előadások összefoglalása, 234. oldal) specifikus ak-
20 tivitása kicsi, és kis pH-tartományban aktív. Ezenkívül a *Paracoccus sp.*-ből származó enzim [JP-A-03-61481) Km értéke nagy formiátra.

További probléma az, hogy míg a halogénketon vegyületekből redukálással előállítható termékek (például halogénalkoholok) nagyon hasznos vegyületek például gyógyászati termékek kiindulási anyagaként, az eddig ismertett
25 formiát-dehidrogenázok mind inaktiválódtak egy halogénketon vegyület jelenlétében, tehát ha egy halogénketon vegyület enzimatis redukálására használt reakciórendszerhez adták azokat, egyik sem volt képes regenerálni a koenzimet. Tehát ezidáig nem volt ismert olyan formiát-dehidrogenáz, amely jó hatékonysággal képes lett volna a koenzimet regenerálni egy halogénketon
30 vegyület enzimatis redukciós reakciórendszerében.

A baktériumokból származó formiát-dehidrogenázokat tekintve ismertek olyan enzimek is, amelyek nem igényelnek NAD-ot elektron akceptorként (EC1.2.2.1), ilyenek például az *Escherichia coli*-ből [J. Biol. Chem. 250, 6693 (1975)], *Clostridium pasteurianum*-ból [J. Bacteriol. 159, 375 (1984)],
 5 *Clostridium thermoaceticum*-ból [J. Biol. Chem. 259, 1826 (1983)] származó enzimek, azonban ezeket nem lehet a NAD koenzim regenerálására használni.

A bakteriális NAD-függő formiát-dehidrogenáz gének transzformánsokban való expresszióját tekintve ismertek a *Pseudomonas sp. 101*-ből [Biotechnol. Appl. Biochem. 18, 201 (1993)], *Mycobacterium vaccae*-ből [Appl. Microbiol. Biotechnol. 44, 479 (1995), JP-A-10-23896), *Pyrococcus KOD1*-ből (JP-A-2000-69971), *Hyphomicrobium sp.*-ből [JP-A-2000-78970 Congress of Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry (1999), a kongresszuson felolvasott előadások összefoglalása, 234. oldal] származó gének,
 10 azonban eddig nem volt ismert olyan formiát-dehidrogenáz gén, amely *Thiobacillus* génuszba tartozó mikroorganizmusból származott volna.

Ismert, hogy a *Thiobacillus* génuszba tartozó baktériumok formiát-dehidrogenáz aktivitással rendelkeznek nyers enzimoldatokban [J. Bacteriol. 131, 389 (1977)], azonban nem volt ismert az ilyen enzim tisztítása és izolálása, sem annak jellemzése, továbbá az sem ismert, hogy a megfelelő releváns gént va-
 20 laha is izolálták volna.

A találmányt összefoglalóan az alábbiakban ismertetjük.

A találmány olyan formiát-dehidrogenázra vonatkozik, amely az eddig ismert formiát-dehidrogenázok említett hátrányaitól mentes, mint amilyen az alacsony enzimaktivitás, az alacsony specifikus aktivitás, a nagy Km érték formiátra és NAD-ra, a szűk hőmérséklet- és pH-tartományban mutatott stabilitás, és működőképesség szűk pH-tartománya, azonban ipari alkalmazhatóság szempontjából jó tulajdonságokkal rendelkezik, például jó toleranciát mutat halogénketon vegyületekkel szemben, valamint eljárásra a fenti enzim előállítására. A találmány további tárgya eljárás a koenzim jó hatékonysággal történő regenerálására még enzimatis redukciós reakciórendszerekben is, külö-
 25
 30

nösen halogénketon vegyületek enzimatisz redukciójában, ahol az ismert formiát-dehidrogenázok inaktiválódnak.

A technika fent ismertetett állásának ismeretében kiterjedt szűrővizsgálatot végeztünk olyan talajból származó mikroorganizmusokra, amelyek formiát-dehidrogenáz aktivitással rendelkeznek, és ennek eredményeként elsőként izoláltunk egy *Thiobacillus* gúnuszba tartozó mikroorganizmus törzset, amely olyan formiát-dehidrogenázt képes termelni, amely ipari méretekben is elfogadható tulajdonságokkal rendelkezik. Ebből a mikroorganizmus törzsből izoláltuk és tisztítottuk a formiát-dehidrogenázt, és sikerült egy formiát-dehidrogenáz gént is izolálni, és ezt a gént egy gazda mikroorganizmusban expresszálni. Ezenkívül azt találtuk, hogy a találmány szerinti formiát-dehidrogenáz halogénketon vegyületekkel szemben toleráns, és a koenzim regenerálására jó hatékonysággal képes még egy halogénketon vegyület enzimatisz redukciós rendszerében is.

15 A találmány tárgyát tehát egy polipeptid képezi, amely halogénketon vegyületekkel szemben toleráns, és formiát-dehidrogenáz aktivitást mutat.

A találmány tárgya továbbá egy polipeptid, amely az alábbi fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkezik:

- 20 (1) hatás: koenzimként NAD alkalmazásával a formiátokat oxidálja és széndioxidot termel;
- (2) móltömeg: körülbelül 9×10^4 ;
- (3) Km érték formiátra: 1,6 mM;
- (4) Km érték NAD-ra: 0,048 mM;
- 25 (5) működőkéességének hőmérséklettartománya: 20 °C - 65 °C, optimális hőmérséklet 50 °C - 60 °C;
- (6) működőkéességének pH-tartománya: 5,0 - 10,5, optimális pH: 5,5 - 9,5;
- (7) a stabilitás hőmérséklettartománya: 50 °C fölött nem stabil;
- (8) a stabilitás pH-tartománya: 4,5 - 9,0.

A találmány szerinti fenti polipeptid nemcsak toleráns halogénketon vegyületekkel szemben, hanem nagy specifikus aktivitással rendelkezik, kis Km értékkel rendelkezik formiátra és NAD-ra, széles hőmérséklet- és pH-tartományban stabil, széles hőmérséklet- és pH-tartományban aktív, és minden olyan jellemzővel bír, amely alkalmassá teszi ipari felhasználásra.

A találmány további tárgyát képezik az alábbi polipeptidek:

- (a) polipeptid, amely a szekvencialistában 1. számú szekvenciaként azonosított aminosav-szekvenciát tartalmazza;
- (b) polipeptid, amely a szekvencialistában 1. számú szekvenciaként azonosított aminosav-szekvenciából egy vagy több aminosav szubsztitúciójával, inszerciójával, deléciójával és/vagy addíciójával származtatott aminosav-szekvenciát tartalmaz, és formiát-dehidrogenáz aktivitással rendelkezik.

A találmány tárgyát képezi továbbá a fenti polipeptidet kódoló DNS is.

A találmány további tárgya egy alábbi DNS:

- (c) DNS, amely a szekvencialistában 2. számú szekvenciaként azonosított bázisszekvenciát tartalmazza;
- (d) DNS, amely a szekvencialistában 2. számú szekvenciaként azonosított bázisszekvenciából egy vagy több bázis szubsztitúciójával, inszerciójával, deléciójával és/vagy addíciójával származtatott bázisszekvenciát tartalmaz, és formiát-dehidrogenáz aktivitással rendelkező polipeptidet kódol.

A találmány további tárgya egy alábbi DNS:

- (e) DNS, amely a szekvencialistában 3. számú szekvenciaként azonosított bázisszekvenciát tartalmazza;
- (f) DNS, amely a szekvencialistában 3. számú szekvenciaként azonosított bázisszekvenciából egy vagy több bázis szubsztitúciójával, inszerciójával, deléciójával és/vagy addíciójával származtatott bázisszekvenciát

tartalmaz, és formiát-dehidrogenáz aktivitással rendelkező polipeptidet kódol.

A találmány további tárgya egy rekombináns plazmid, amely a fenti DNS-t tartalmazza.

- 5 A találmány további tárgya egy transzformáns, amely egy gazda mikroorganizmus fenti rekombináns plazmiddal való transzformálásával állítható elő.

A találmány további tárgya eljárás formiát-dehidrogenáz előállítására, oly módon, hogy a fenti polipeptidet termelő mikroorganizmus törzset vagy a fenti transzformánst tenyésztőközegben tenyésztve a fenti polipeptidet hagyjuk
10 termelődni és felhalmozódni, majd begyűjtjük.

A találmány további tárgya eljárás egy koenzim regenerálására, amely megengedi a fenti polipeptid, vagy a fenti polipeptidet termelő mikroorganizmus törzs, vagy egy abból nyert feldolgozott anyag jelenlétét egy enzimatikus redukciós reakciórendszerben.

- 15 A találmányt részletesen az alábbiakban ismertetjük.

Elsősorban ismertetjük a találmány szerinti polipeptidet. A találmány szerinti polipeptid halogénketon vegyületekkel szemben toleráns, és formiát-dehidrogenáz aktivitással rendelkezik.

- Ezenkívül a találmány szerinti polipeptid egy olyan polipeptid, amely formiát-dehidrogenáz aktivitással rendelkezik, és az alábbi fizikai-kémiai tulajdonságokkal bír:
20

- (1) hatás: koenzimként NAD alkalmazásával a formiátokat oxidálja és széndioxidot termel;
- (2) móltömeg: körülbelül 9×10^4 ;
- 25 (3) Km érték formiátra: 1,6 mM;
- (4) Km érték NAD-ra: 0,048 mM;
- (5) működőképességének hőmérséklettartománya: 20 °C - 65 °C, optimális hőmérséklet 50 °C - 60 °C;
- (6) működőképességének pH-tartománya: 5,0 - 10,5, optimális pH: 5,5 - 9,5;

(7) a stabilitás hőmérséklettartománya: 50 °C fölött nem stabil;

(8) a stabilitás pH-tartománya: 4,5 - 9,0.

Jelen esetben polipeptid formiát-dehidrogenáz aktivitását úgy határoztuk meg, hogy 340 nm-en mértük az abszorpció növekedését, amely 30 °C-on vagy
 5 40 °C-on a NADH keletkezéséből származott 500 mM nátrium-formiátot és 5 mM NAD-ot tartalmazó 0,1 M foszfát pufferben (pH 7).

A móltömeget gélszűrési kromatográfiával határoztuk meg. A K_m értéket formiátra úgy határoztuk meg, hogy az aktivitás vizsgálatának fenti körülményei között (30 °C, NAD 5 mM) mértük az aktivitást, miközben a nátrium-
 10 formiát koncentrációját változtattuk, és a NAD-ra a K_m értéket úgy határoztuk meg, hogy az aktivitás vizsgálatának fenti körülményei között (30 °C, nátrium-formiát 500 mM) mértük az aktivitást, miközben a NAD koncentrációját változtattuk.

A működőképességhez szükséges hőmérsékletet és pH-t úgy határoztuk meg, hogy mértük az aktivitást, miközben az aktivitási vizsgálat fenti körülményei között a hőmérsékletet vagy a pH-t változtattuk. A hőmérsékleti stabilitást úgy értékeltük ki, hogy a polipeptidet az egyes hőmérsékleteken 10 percen keresztül kezeltük, és mértük a maradék aktivitást. A pH-stabilitást úgy határoztuk meg, hogy a polipeptidet 30 °C-on 22 órán keresztül kezeltük az egyes
 20 pH értékeken, és mértük a maradék aktivitást.

A találmány szerinti polipeptid halogénketon vegyületekkel szemben toleráns. A "halogénketon vegyületekkel szemben toleráns" kifejezés a jelen összefüggésben azt jelenti, hogy a nyers enzimdát maradék aktivitása 30 °C-on, 10 mM etil-4-klóracetoacetát jelenlétében, 5 percen keresztül történő inkubálás után legalább 25%.

A találmány szerinti polipeptid formiát-dehidrogenáz aktivitással rendelkező mikroorganizmusokból nyerhetjük. Ezért a találmány szerinti polipeptid forrásként alkalmazható mikroorganizmusként előnyösen metanolt hasznosító baktériumokat és formiátot hasznosító baktériumokat alkalmazhatunk. Ennek megfelelően - a korlátozás szándéka nélkül - használhatunk például

Thiobacillus génuszba tartozó mikroorganizmusokat. Közelebbről, előnyös a *Thiobacillus* sp., és különösen előnyös a *Thiobacillus* sp. KNK65MA.

A fent említett *Thiobacillus* sp. KNK65MA törzset mi izoláltuk és 2001. július 19-én helyeztük letétbe FERM BP-7671 számon (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology International Patent Organism Depository, Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japán). A *Thiobacillus* sp. KNK65MA bakteriológiai jellemzőit az alábbiakban foglaljuk össze.

1. Morfológia

1) Körülbelül 0,6 µm átmérőjű és 1,5 x 2,5 µm hosszúságú bacillus

10 2) Gram festődés: negatív

3) motilitás: nem-motilis

4) sporogenezis: nem-spórázó

5) telepek húsleves agar lemezen: kerek, sima teljes szél, kissé konvex, fényes, halványsárga (áttetsző)

15 2. Tenyésztési tulajdonságok

1) Húsleves folyékony tenyészet: szuszpendált

2) lakmusztej: változatlan

3. Fiziológiai tulajdonságok

1) kataláz: +

20 2) oxidáz: +

3) O/F teszt: -

4) denitrifikáció: +

5) MR-teszt: +

6) VP-teszt: +

25 7) hidrogén-szulfid termelés: -

8) citromsav hasznosítás

- Koser: -
- Christensen: -
- 9) szervesetlen nitrogénforrás hasznosítás
- NaNO₃: -
- 5 (NH₄)₂SO₄: -
- 10) keményítő hidrolízis: -
- 11) nitrát redukció: -
- 12) indol termelés: -
- 13) glükóz savanyítás: -
- 10 14) arginin-dihidroláz: -
- 15) ureáz: -
- 16) β-galaktozidáz: +
- 17) eszkurin hidrolízis: +
- 18) zselatin hidrolízis: -
- 15 19) szaporodáshoz
- pH 3,0: -
- 5,0: -
- 8,0: +
- hőmérséklet (°C) 30: +
- 20 50: -
- 20) biotin szükséglet: +
- 21) anaerób szaporodás: +
- 22) kénvegyületek hasznosítása
- elemi kén: -
- 25 nátrium-tioszulfát: +

23) etanol oxidáció: +_w

24) sav- és gáztermelés szénhidrátokból O-F közegben (sav/gáz)

L-arabinóz: -/-

D-glükóz: -/-

5 D-fruktóz: -/-

maltóz: -/-

laktóz: -/-

D-szorbit: -/-

inozit: -/-

10 keményítő: -/-

D-xilóz: -/-

D-mannóz: -/-

D-galaktóz: -/-

szacharóz: -/-

15 trehalóz: -/-

D-mannit: +/-

glicerin: -/-;

25) szubsztrát hasznosítás

glükóz: +

20 L-arabinóz: -

D-mannóz: -

D-mannit: +

N-acetil-D-glükózamin: -

maltóz: -

25 kálium-glükonát: +



n-kaprinsav: -

adipinsav: -

dl-almasav: -

nátrium-citrát: -

5 fenil-acetát: -

A találmány szerinti polipeptidet termelő mikroorganizmus tenyésztőközegeként vizes közeget alkalmazunk, amely fő szénforrásként metanolt tartalmaz nitrogénforrásokkal és tápanyagokkal, például szervesen oldható sókkal együtt. Megfelelő eredményeket kaptunk sok esetben, ha szervesen oldható tápanyagokat, például vitaminokat és aminosavakat adtunk a tápközeghez. Nitrogénforrásként ammóniumsók, vizes ammónia, ammóniagáz, karbamid, élesztő extraktum, peptonok, kukoricalékvar, stb. alkalmazhatók. Szervesen oldható sóként foszfátokat, magnéziumsók, káliumsók, nátriumsók, kalciumsók, vassók, szulfátokat és kloridokat alkalmazhatunk.

15 A tenyésztést általában 20 és 40 °C, előnyösen 20 és 30 °C közötti hőmérséklettartományban végezhetjük. A tenyésztés pH-tartománya 6,0 - 9,0, és előnyösen 7,0 - 9,0 lehet. A tenyésztés lehet folyamatos vagy szakaszos.

A tenyésztőközegeből való elválasztást és tisztítást úgy végezhetjük, hogy a sejteket a tenyésztés befejeztével például a tenyésztőközeg centrifugálásával összegyűjtjük, és a sejteket például ultrahanggal feltárjuk, így módon kinyerjük a nyers enzimoldatot. A találmány szerinti polipeptidet a nyers enzimoldat tisztításával állíthatjuk elő, a tisztítást például kisózással vagy oszlopkromatográfián végezhetjük.

25 A találmány szerinti polipeptid lehet egy natív enzim, amelyet a fentiek szerint nyerünk a mikroorganizmusból, vagy rekombináns enzim, amelyet rekombináns géntechnológia alkalmazásával állítunk elő.

Natív enzimként a szekvencialistában 1. számú szekvenciaként azonosított polipeptidet említhetjük.



A találmány szerinti polipeptid egy olyan polipeptid is lehet, amely az 1. számú szekvenciaként azonosított aminosav-szekvenciából egy vagy több aminosav szubsztitúciójával, inszerciójával, deléciójával és/vagy addíciójával származtatott aminosav-szekvenciát tartalmazza, és formiát-dehidrogenáz aktivitással rendelkezik.

A "egy vagy több aminosav szubsztitúciójával, inszerciójával, deléciójával és/vagy addíciójával származtatott aminosav-szekvencia" szakember számára jól ismert módszerekkel állítható elő, például hely-specifikus mutagenézissel, egy vagy több aminosav fent említett szubsztitúciója, inszerciója, deléciója és/vagy addíciója útján. A különösen megfelelő eljárások szakirodalomból ismertek [lásd például Nucleic Acid Res. 10, 6487 (1982); Methods in Enzymology 100, 448 (1983)].

A "formiát-dihidrogenáz aktivitással rendelkező polipeptid" kifejezés bármely olyan polipeptidet jelent, amely az 1. számú szekvenciaként azonosított aminosav-szekvenciát tartalmazó polipeptid aktivitásának legalább 10%-át, előnyösen legalább 40%-át, még előnyösebben legalább 60%-át, ennél is előnyösebben legalább 80%-át mutatja az aktivitás vizsgálatának fent ismertetett körülményei között meghatározva.

Az alábbiakban a találmány szerinti DNS-t ismertetjük. A találmány szerinti DNS bármely olyan DNS lehet, amely egy fent definiált polipeptidet kódol. Ez lehet például egy olyan DNS, amely a szekvencialistában a 2. vagy 3. számú szekvenciaként azonosított bázisszekvenciát tartalmazza. Ezenkívül ez lehet bármely olyan DNS, amely a 2. vagy 3. számú szekvenciaként azonosított bázisszekvenciából egy vagy több bázis szubsztitúciójával, inszerciójával, deléciójával és/vagy addíciójával származtatott bázisszekvenciával rendelkezik, és formiát-dehidrogenáz aktivitással rendelkező polipeptidet kódol.

Az "egy vagy több bázis szubsztitúciójával, inszerciójával, deléciójával és/vagy addíciójával származtatott bázisszekvencia" egy olyan bázisszekvenciát jelent, amely annyi bázis szubsztitúciójával, inszerciójával, deléciójával és/vagy addíciójával nyerhető, amennyi szakember számára ismert módon szubsztituálható, inszertálható, törölhető és/vagy hozzáadható [lásd például



Supplemental Issue, Tanpakushitsu, Kakusan, Koso (Protein, Nucleic Acid and Enzyme), PCR Method for Gene Amplification, TAKKAJ, 35 (17), 2951-3178 (1990) vagy Henry A. Erlich (szerk.) (japán fordítását lektorálta Ikunoshin Kato): PCR Technology (1990)].

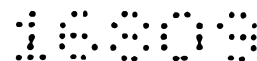
- 5 Ezenkívül ez lehet egy olyan DNS is, amely a 2. vagy 3. számú szekvenciaként azonosított bázisszekvenciát tartalmazó DNS-sel hibridizál szigorú körülmények között, és formiát-dehidrogenáz aktivitással rendelkező polipeptidet kódol.

A "DNS, amely a 2. vagy 3. számú szekvenciaként azonosított bázisszekvenciát tartalmazó DNS-sel szigorú körülmények között hibridizál" kifejezés egy olyan DNS-t jelent, amelyet kolónia hibridizációval, plakk hibridizációval, Southern hibridizációval vagy hasonló módszerrel nyerhetünk a 2. vagy 3. bázisszekvenciát mint szondát tartalmazó DNS alkalmazásával. A találmány szerinti DNS előállítására céljából szakember egyszerűen végrehajthatja az ilyen hibridizációs eljárásokat szakirodalomban leírtak szerint [Molecular Cloning, 15 2. kiadás (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)].

A találmány szerinti DNS (formiát-dehidrogenáz gén) a formiát-dehidrogenáz aktivitással rendelkező fent említett mikroorganizmusból nyerhető. A találmány szerinti DNS-t például az alábbi eljárással állíthatjuk elő.

- 20 Először is, a formiát-dehidrogenáz aktivitással rendelkező mikroorganizmus törzsből tisztított formiát-dehidrogenáz amino-terminálisának aminosav-szekvenciáját például gázfázisú protein szekvenátor alkalmazásával meghatározzuk. Ezután szintetizáljuk a fenti aminosav-szekvencia alapján tervezett DNS primert, és az ismert formiát-dehidrogenáz gének bázisszekvenciájával nagy homológiát mutató szekvencia alapján tervezett DNS primert.

Ezután a formiát-dehidrogenáz forrásul szolgáló mikroorganizmusokból izoláljuk a kromoszomális DNS-t. A kromoszomális DNS-t úgy állíthatjuk elő, hogy a tenyésztett sejteket lizáljuk és például egy felületaktív szerrel, CTAB-vel, kloroformmal, fenollal és hasonlóval extraháljuk, az extrahált DNS-t izopropil-alkoholból kicsapjuk, centrifugáljuk, és a kapott DNS üledéket eta-



nollal mossuk [lásd például Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience)].

A találmány szerinti gén egy részét PCR alkalmazásával állíthatjuk elő a fenti kromoszomális DNS mint templát és a fent említett primerek alkalmazásával.

5 Ezután a találmány szerinti gén teljes hosszának előállítására a fentiek szerint előállított kromoszomális DNS-t megfelelő restriktív enzimekkel, például HindIII-mal és EcoRI-vel emésztjük, és agaróz-elektroforézisnek vetjük alá. Szondaként a fent említett formiát-dehidrogenáz gén egy részét képező PCR-rel előállított fenti DNS fragmentumot alkalmazva, Southern hibridizációt
10 végzünk, és a gélben detektáljuk a formiát-dehidrogenáz gént tartalmazó, és a formiát-dehidrogenáz génben a fenti restriktív enzimekkel nem hasított DNS fragmentumot.

Ezt a DNS fragmentumot a gélből kinyerjük, és például T4 DNS-ligázzal ciklizáljuk, és a kapott DNS mint templát és a parciális formiát-dehidrogenáz
15 génnek az enzim N-terminális és C-terminális régióinak megfelelő bázisszekvenciái alapján szintetizált DNS primerek alkalmazásával, amelyeket PCR-rel állítottunk elő a fentiek szerint és a fenti enzim génjétől kifelé irányulnak, PCR-t hajtunk végre, ily módon megszerkesztjük a fenti primerekkel kapott parciális gén további N-terminális és C-terminális oldalait kódoló DNS
20 fragmenseket. A DNS fragmentumok szekvenálása után DNS primereket szerkesztünk a DNS-ek azon következtetett bázisszekvenciái alapján, amelyek az enzim N-terminálisát kódoló DNS-től felfelé és C-terminálisát kódoló DNS-től lefelé jelen vannak, és megsokszorozzuk a fenti szekvenciák közötti DNS-t, ily módon a teljes hosszúságú formiát-dehidrogenáz gént tartalmazó DNS
25 fragmentumot nyerjük. Az így kapott DNS fragmentum móltömegének meghatározásával és parciális bázisszekvencia analízisével igazolhatjuk, hogy az a találmány szerinti formiát-dehidrogenáz gén teljes hosszát tartalmazza.

Ezután a fentiek szerint előállított, formiát-dehidrogenáz gént tartalmazó DNS fragmentumot egy vektor DNS-be építhetjük be például T4 DNS-ligáz alkalmazásával, így rekombináns plazmidot kapunk. A fenti plazmid alkalmazásával a vektorba inszertált formiát-dehidrogenáz gént tartalmazó DNS
30



fragmentumot szekvenáljuk, hogy igazoljuk a formiát-dehidrogenáz N-terminális aminosav-szekvenciáját kódoló bázisok jelenlétét. Ezenkívül a transláció iniciációs helyét meghatározzuk, és a terminációs kodontól lefelé eső szekvencia mint nyílt leolvasási keret alkalmazásával igazoljuk, hogy ez a bázisszekvencia viszonylag nagy homológiát mutat az ismert formiát-dehidrogenáz génnel, a kódolt protein az elektroforézissel meghatározott mól-tömegnek felel meg, stb., ezáltal a terméket mint a kívánt gént azonosítjuk.

Ezután egy gazda mikroorganizmus törzset az így kapott DNS-sel vagy a fenti DNS vektorba való beépítésével előállított rekombináns plazmiddal transzformálva transzformánst kapunk.

Ami a gazdát és a vektort illeti, szakirodalomból ismert gazda-vektor rendszerek alkalmazhatók [Recombinant DNA Experimentation Guidelines" (szerk.: Life Science Section, Research and Development Bureau of Science and Technology Agency, Japán, 1996. március 22.)]. Gazdaként például bármely alábbi génuszba tartozó mikroorganizmus alkalmazható: *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Serratia*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* és *Streptomyces*, többek között. Vektorként mikrobás eredetű plazmidok és fágok, és ezek származékai alkalmazhatók, amelyek a fent említett gazdáknál autonóm replikációra képesek. Különösen előnyös gazda mikroorganizmus az *Escherichia coli* és a megfelelő vektor, amely a fenti mikroorganizmusban autonóm replikációra képes. Ilyen vektorok például a pUC18, pUC19, pBR322, pACYC184, pSC101 és pUCNT.

A transzformánsokat tekintve, a rekombináns pFT001 plazmid (amelyet a fentiek szerint előállított DNS pUC19 vektorba való beépítésével kapunk) vagy a rekombináns pFT002 (amelyet a fenti DNS pUCNT vektorba való beépítésével szerkesztünk meg (WO 94/03613) alkalmazható *Escherichia coli* HB101 transzformálására, ily módon kapjuk az *Escherichia coli* HB101 (pFT001) vagy *Escherichia coli* HB101 (pFT002) transzformánsokat. A rekombináns pFT001 plazmid az 1. ábrán, míg a rekombináns pFT002 plazmid a 2. ábrán látható.



A találmány szerinti *Escherichia coli* HB101 (pFT001) és *Escherichia coli* HB101 (pFT002) transzformánsokat 2001. július 19-én helyeztük letétbe FERM BP-7672 és FERM BP-7673 számon (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology International Patent Organism Depository, 5 Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japán).

Az enzimtermelés növelésére egy erős strukturális promótert tartalmazó módosított vektort alkalmazhatunk.

A találmány értelmében alkalmazott rekombináns DNS technológia szakember számára jól ismert [lásd például Molecular Cloning 2. kiadás (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience)]. 10

A formiát-dehidrogenáz termelésére alkalmas találmány szerinti eljárás jellemzője, hogy a fent említett polipeptid termelésére képes mikroorganizmus törzset a fenti polipeptid termelésére és felhalmozására alkalmas tenyésztő- 15 közegben tenyésztjük, majd a felhalmozódott polipeptidet begyűjtjük.

A formiát-dehidrogenáz előállítására alkalmas találmány szerinti eljárás jellemzője továbbá, hogy a fenti transzformánst a formiát-dehidrogenáz termelésére és felhalmozására alkalmas tenyésztőközegben tenyésztjük, és az így felhalmozódott formiát-dehidrogenázt begyűjtjük.

20 A formiát-dehidrogenáz előállítását a találmány szerinti transzformáns alkalmazásával úgy hajthatjuk végre, hogy a transzformánst egy szokásos közegben tenyésztjük. A tenyésztésre alkalmazott közeg szénforrást, nitrogénforrást és tápanyagokat, például szervesetlen sókat tartalmazó szokásos közeg lehet. Kiváló eredményeket gyakran értünk el akkor, ha szerves nyom-tápanyagokat, 25 például vitaminokat és aminosavakat is alkalmaztunk. Ami a szénforrást illeti, szénhidrátok, például glükóz és szacharóz, szerves savak, például ecetsav és egyéb savak, és alkoholok alkalmazhatók szokásos módon. Nitrogénforrásként ammóniumsókat, vizes ammóniát, ammónia gázt, karbamidot, élesztő extraktumot, peptonokat, kukoricaekkvárt, stb. alkalmazhatunk. Szervesetlen sóként 30 különféle foszfátokat, magnéziumsókat, káliumsókat, nátriumsókat, kalciumsókat, vassókat, szulfátokat és kloridokat alkalmazhatunk.



A tenyésztést 25 - 40 °C hőmérséklettartományban végezhetjük, azonban különösen előnyös a 25 - 37 °C tartomány. A tenyésztés pH-tartománya 4 és 8 között lehet, előnyösen 5 - 7,5. A tenyésztési eljárás lehet folyamatos vagy szakaszos.

- 5 Szükség esetén enzimindukciós kezelést végezhetünk, például metanolt, hangyasavat, izopropil-1-tio- β -D-galaktozidot (IPTG), laktózt vagy hasonlót adagolhatunk.

10 A koenzim regenerálását úgy érhetjük el, hogy megengedjük a fenti polipeptid, vagy a fenti polipeptid termelésére képes mikroorganizmus törzs vagy annak feldolgozott anyaga jelenlétét az enzimátikus redukciós reakciórendszerben. Tehát, ha a találmány szerinti formiát-dehidrogenáz jelen van egy enzimátikus redukciós reakciórendszerben, a koenzim jó hatékonysággal regenerálható. Közelebbről, a koenzim hatékonyan regenerálható a fenti enzim jelenlétében még egy halogénketon vegyület vagy hasonló enzimátikus redukciós rendszerében is, amely a szokásos formiát-dehidrogenázt inaktiválná.

15 Például egy halogénketon, például etil-4-klóracetoacetát enzimátikus redukciós reakciója a találmány szerinti formiát-dehidrogenáz alkalmazásával a koenzim regenerálására az alábbiak szerint hajtható végre.

20 A fenti reakciót végrehajthatjuk vízben, vagy vízben nehezen oldódó szerves oldószerben, például etil-acetátban, butil-acetátban, toluolban, kloroformban vagy n-hexánban, vagy egy kétfázisú rendszerben, amely egy fenti szerves oldószerből és egy vizes közegből áll. A reakciót úgy játszathatjuk le, hogy a fenti oldószerhez hozzáadunk egy halogénketon szubsztrátot, a NAD koenzimet, és vagy egy halogénketon-reduktázt, vagy egy fenti reduktáz aktivitással rendelkező mikroorganizmust, vagy annak egy feldolgozott anyagát, és a találmány szerinti polipeptidet (azaz halogénketonnal szemben toleráns formiát-dehidrogenázt) vagy a fenti polipeptidet termelni képes mikroorganizmust vagy annak egy feldolgozott anyagát, és az elegyet megfelelő pH szabályozás mellett hangyasavval keverjük.

30 A halogénketon vegyület nem különösebben kritikus, feltéve, hogy az az alkalmazott reduktáz és mikroorganizmus szubsztrátja lehet, ilyenek például az



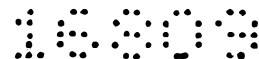
etil-4-klór-acetoacetát, etil-4-brómacetoacetát, etil-4-jód-acetoacetát, metil-4-klór-acetoacetát, etil-2-klór-acetoacetát, 2-klór-1-(3-piridinil)etanon, 1,1-dimetiletil-[(1S)-3-klór-2-oxo-1-(fenilmetil)propil]karbamát, 2-klór-acetofenon, 2,3'-diklór-acetofenon, klór-aceton, 1-(benziloxi)-3-klór-2-propanon és 1-klór-3-hidroxi-2-propanon, többek között. Előnyös szubsztrátok az α -halogénketonok, például etil-4-klór-acetoacetát, metil-4-klór-acetoacetát, etil-2-klór-acetoacetát, 1,1-dimetiletil-[(1S)-3-klór-2-oxo-1-(fenilmetil)propil]karbamát, 2,3'-diklór-acetofenon és 1-(benziloxi)-3-klór-2-propanon.

Ami a fenti reduktázt vagy a halogénketon vegyület redukálására képes mikroorganizmust illeti, többek között a rekombináns *Escherichia coli* HB101 (pNTS1M1) (FERM BP-8059) alkalmazható, amely az etil-4-klór-acetoacetátot a megfelelő alkohollá képes redukálni. Ezt a rekombináns *E. coli* HB101 (pNTS1M1) törzset eredetileg 2001. június 22-én helyeztük letétbe, és 2002. május 27-én alakítottuk át Budapesti Egyezmény szerinti letétté, letéti száma FERM BP-8059 (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japán). Magától értetődően, ha aldehid-dehidrogenázt vagy aminosav-dehidrogenázt, vagy a megfelelő aktivitással rendelkező mikroorganizmust vagy annak feldolgozott anyagát alkalmazzuk reduktázként, termékként a megfelelő aldehidet vagy amint kapjuk.

A találmány szerinti polipeptid termelésére alkalmas mikroorganizmusként például a fent említett *Escherichia coli* HB101 (pFT001) vagy *Escherichia coli* HB101 (pFT002) transzformáns alkalmazható.

A "feldolgozott anyag" kifejezés a fent említett mikroorganizmussal kapcsolatban a tenyésztett sejtek nyers extraktumát, liofilizált preparátumát vagy acetonnal szárított preparátumát, vagy a fenti sejtek szétzúzott anyagát jelenti. Ezenkívül ezeket alkalmazhatjuk immobilizált enzim vagy sejt formájában is szokásos módon. Az immobilizálást különféle módszerekkel hajthatjuk végre szakember számára ismert módon (például térhálósítással, fizikai abszorpcióval, zárványképzéssel, stb.).

A reakciót 10 °C és 70 °C, előnyösen 20 °C és 60 °C közötti hőmérsékleten, és pH 4 - 10, előnyösen pH 5,5 - 9,5 értéken hajthatjuk végre. A betöltött



szubsztrát koncentrációja 0,1 - 90 vegyes%, azonban a szubsztrátot folyamatosan is adagolhatjuk. A reakciót lejátszathatjuk szakaszosan vagy folyamatosan. A találmány szerinti reakció végrehajtható immobilizált enzim, membrán reaktor és/vagy egyéb eszközök alkalmazásával.

- 5 Amint azt fent ismertettük, a találmány szerinti eljárás olyan, hogy az etil-4-klór-3-hidroxi-butirát vagy egyéb alkoholok, aminok, aldehidek vagy hasonló enzimatikus redukciós reakcióban való előállításánál lehetővé teszi a koenzim hatékony regenerációját, ami hozzájárul a drága koenzim felhasználásának drasztikus csökkentéséhez.
- 10 Az ábrákat röviden az alábbiakban ismertetjük.
- Az 1. ábra a találmány szerinti formiát-dehidrogenáz gént tartalmazó rekombináns pFT001 plazmid restrikciós enzim térképe.
- A 2. ábra a találmány szerinti formiát-dehidrogenáz gént tartalmazó rekombináns pFT002 plazmid restrikciós enzim térképe.
- 15 A 3. ábra egy grafikon a találmány szerinti formiát-dehidrogenáz K_m értékének meghatározásához formiátra.
- A 4. ábra egy grafikon a találmány szerinti formiát-dehidrogenáz K_m értékének meghatározásához NAD-ra.
- Az 5. ábra egy grafikon a találmány szerinti formiát-dehidrogenáz működőképességének hőmérséklettartománya és az optimális hőmérséklet meghatározásához.
- 20 A 6. ábra egy grafikon a találmány szerinti formiát-dehidrogenáz működőképességének pH-tartománya és az optimális pH meghatározásához.
- A 7. ábra egy grafikon a találmány szerinti formiát-dehidrogenáz hőmérsékleti
- 25 stabilitásának meghatározásához.
- A 8. ábra egy grafikon a találmány szerinti formiát-dehidrogenáz pH stabilitásának meghatározásához.
- A találmány legelőnyösebb kiviteli alakjait az alábbiakban ismertetjük.

A találmányt részletesebben az alábbi példákkal kívánjuk szemléltetni a korlátozás szándéka nélkül.

1. példa

***Thiobacillus* sp. KNK65MR törzs izolálása**

- 5 A találmány szerinti formiát-dehidrogenázt erősen termelő törzset, a *Thiobacillus* sp. KNK65MA-t az alábbiak szerint izoláltuk. A különféle geográfiai helyekről begyűjtött talajmintákat 0,9%-os sóoldatban szuszpendáltuk. Az így kapott egyes felülúszókat 1% mennyiségben 7 ml cseppfolyós tápközegre oltottuk le, amelynek összetételét az 1. táblázat mutatja, és amely
- 10 egyetlen szénforrásként metanolt tartalmaz, majd aerób körülmények között 30 °C-on rázott tenyészetet készítettünk.

1. táblázat

Metanol	8 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
KH ₂ PO ₄	0,15 g
K ₂ HPO ₄	4,85 g
MgSO ₄	0,5 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂	0,1 g
Hús-extraktum	0,1 g
Élesztő-extraktum	0,1 g
Polipepton	0,1g
Biotin	20 µg
Kalcium-pantotenát	2 mg



Folsav	2 µg
Inozit	10 mg
Niacin	400 µg
p-Aminobenzoészav	200 µg
Piridoxin-hidroklorid	400 µg
Riboflavin	200 µg
Tiamin-hidroklorid	400 µg
Bórsav	500 µg
CuSO ₄	40 µg
KI	100 µg
FeCl ₃	200 µg
MnSO ₄	400 µg
Na ₂ MoO ₄	200 µg
ZnSO ₄	400 µg

A fenti összetételt 1 literre töltöttük fel vízzel, pH 9 értékre állítottuk, autoklavozással sterilizáltuk és felhasználtuk. Azonban a metanolt a sterilizálás után adtuk hozzá.

5 A bakteriális szaporodást mutató egyes tenyésztőközegekben a sejtkoncentrációt 600 nm-en az abszorpció mérésével analizáltuk. A fenti tenyésztőközegekből vett 1,5 ml minták centrifugálásával kapott sejteket 0,5 ml szubsztrátoldatban (0,1 M foszfát puffer, 0,5 M nátrium-formiát, 1 mM NAD, 1% Triton X-100, pH 7) szuszpendáltuk, és 30 °C-on 20 órán keresztül rázatva tenyésztettük celluláris reakcióhoz. A reakcióelegyet centrifugáltuk, és a felülúszóban
10 a NADH mennyiségét 340 nm-en meghatároztuk. A nagy NADH hozam/sejtkoncentráció hányadossal rendelkező törzseket választottuk ki nagy formiátdehidrogenáz aktivitással rendelkező törzsként. Ezután a kiválasztott törzs tenyésztőközegének 5 ml-ét centrifugáltuk, és a kapott sejteket 0,5 ml 0,1 M



foszfát pufferben (pH 7) szuszpendáltuk, ultrahanggal feltártuk, és centrifugálással, felülúszóként kaptuk a nyers enzimoldatot.

A nyers enzimoldat formiát-dehidrogenáz aktivitását úgy határoztuk meg, hogy mértük 340 nm-en az abszorpció növekedését, amely 500 mM nátrium-
5 -formiátot és 5 mM NAD-t tartalmazó 0,1 M foszfát pufferben 30 °C-on a NADH képződéséből származott.

A protein vizsgálatokat Bradford módszerével [Anal. Biochem. 72, 248 (1976)] végeztük, standard proteinként BSA-t alkalmazva.

A formiát-dehidrogenáz α -halogénketon toleranciáját úgy határoztuk meg,
10 hogy 150 μ l nyers enzimoldatot 150 μ l 20 mM etil-4-klóracetoacetáttal kevertünk, az elegyet 30 °C-on 5 percen keresztül inkubáltuk, és a fent ismertett módon meghatároztuk a formiát-dehidrogenáz aktivitást, és az eredményt összehasonlítottuk a kezelés előtti aktivitással.

Ezután abban az esetben, ha a nyers enzimoldat specifikus aktivitása nagy
15 volt, és az etil-4-klóracetoacetáttal szembeni tolerancia nagy volt, a formiát-dehidrogenáz aktivitással rendelkező törzset a tenyésztőközegekből egytelepes módszerrel izoláltuk, és az így kapott izolált törzset tenyésztve nyers enzimoldatot állítottunk elő a fent leírtak szerint, és az oldatot formiát-dehidrogenáz
20 aktivitásra, proteinkoncentrációra és halogénketon toleranciára analizáltuk. Ezután elvégeztük a nyers enzimoldatok specifikus aktivitásának és halogénketon toleranciájának összehasonlítását minden egyes törzsre, és ennek megfelelően a *Thiobacillus* sp. KNK65MA (FERM BP-7671) törzset választottuk ki mint a nagy specifikus aktivitású és nagy halogénketon toleranciájú formiát-dehidrogenázt termelő legjobb törzset.

25 2. példa

Formiát-dehidrogenáz izolálása és tisztítása

A *Thiobacillus* sp. KNK65MA egy telepét 7 ml tápközegbe inokuláltuk, amelynek összetétele a 2. táblázatban látható, és aerób körülmények között,
30 rázatással, 28 °C-on 2 napon keresztül tenyésztettük. A kapott tenyésztőközeget 1 térfogat% mennyiségben 100 ml/lombik termelőközegre oltottuk,

amelynek összetétele a 3. táblázatban látható, és rázatott tenyészetben, aerób körülmények között, rázatással, 28 °C-on 7 napon keresztül tenyésztettük.

2. táblázat

5

Metanol	20 g
Glicerin	10 g
Tripton	10 g
Élesztő-extraktum	5 g
NaCl	5 g

Az összetételt 1 literre egészítettük ki vízzel, pH 7-re állítottuk, autoklavozással sterilizáltuk, és felhasználtuk. Azonban a metanolt sterilizálás utánadtuk hozzá.

10

3. táblázat

Metanol	20 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
KH ₂ PO ₄	0,15 g
K ₂ HPO ₄	4,85 g
Mg SO ₄	0,5 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂	0,1 g
Hús-extraktum	0,1 g
Élesztő-extraktum	0,1 g
Polipepton	0,1 g

Biotin	20 µg
Kalcium-pantotenát	2 mg
Folsav	2 µg
Inozit	10 mg
Niacin	400 µg
p-Aminobenzoésav	200 µg
Piridoxin-hidroklorid	400 µg
Riboflavin	200 µg
Tiamin-hidroklorid	400 µg
Bórsav	500 µg
CuSO ₄	40 µg
KI	100 µg
FeCl ₃	200 µg
MnSO ₄	400 µg
Na ₂ MoO ₄	200 µg
ZnSO ₄	400 µg

A fenti összetételt vízzel 1 literre egészítettük ki, pH 9-re állítottuk, autoklavozással sterilizáltuk és alkalmaztuk. Azonban a metanolt a sterilizálás után adtuk hozzá.

5 A tenyésztési fázis befejezése után a sejteket centrifugálással összegyűjtöttük, és 1 mM ditiotreitet (DTT) és EDTA-t tartalmazó 0,1 M foszfát pufferben (pH 7,0) szuszpendáltuk. A szuszpenziót ultrahanggal kezeltük, hogy a sejteket feltárjuk, és centrifugáltuk. A felülúszót 25 - 60% telítettségű ammónium-szulfáttal kiséztük, és a csapadékot centrifugálással összegyűjtöttük. Ezt a
10 frakciót 1 mM DTT-t és EDTA-t tartalmazó 0,01 M foszfát pufferben (pH 6,5) oldottuk, és az oldatot azonos összetételű pufferrel szemben dializáltuk. Ezu-

tán DEAE-Sepharose-on (Pharmacia terméke) oszlopkromatográfiát végeztünk, és az oszlopot azonos összetételű pufferrel mostuk, az eluálást 1 mM DTT-t és EDTA-t tartalmazó 0,1 M foszfát pufferrel (pH 6,5) végeztük. Az aktív frakciókat összegyűjtöttük, és 24%-os telítettségig ammónium-szulfátot adtunk hozzá, majd TSKgel Phenyl Toyopearl 650 M kromatográfiás oszlopra (Tosoh Corporation terméke) vittük, és az eluálást 24 - 0% telítettségig ammónium-szulfát grádienssel végeztük 1 mM DTT-t és EDTA-t tartalmazó 0,1 M foszfát pufferben (pH 6,5). Az aktív frakciókhoz ammónium-szulfátot adtunk 70% telítettségig, majd a centrifugálással kapott üledéket 1 mM DTT-t és EDTA-t tartalmazó 0,01 M foszfát pufferben (pH 6,5) oldottuk, majd azonos összetételű pufferrel szemben dializáltuk. Ezután a dialízis után a kapott anyagot Blue Sepharose 6 Fast Flow (Pharmacia terméke) kromatográfiás oszlopra vittük, és az oszlopot azonos összetételű pufferrel mossuk, majd az eluálást azonos összetételű pufferben 0,5 M - 0 M NaCl grádienssel végeztük. Az aktív frakciókat összegyűjtöttük, ultraszűrő membránon (kizárási móltömeg 10000) koncentráltuk, és 1 mM DTT-t és EDTA-t tartalmazó 0,01 M foszfát pufferrel (pH 6,5) szemben dializáltuk. A kapott anyagot Gigapite (Seikagaku Corporation terméke) töltetű oszlopon kromatografáltuk. Az oszlopot 1 mM DTT-t és EDTA-t tartalmazó 2 mM foszfát pufferrel (pH 6,5) mostuk, majd az eluálást 1 mM DTT-t és EDTA-t tartalmazó 50 mM foszfát pufferrel (pH 6,5) végeztük. Az aktív frakciókat összegyűjtöttük, és SDS-poliakrilamid elektroforézissel analizáltuk. Ennek eredményeként a formiát-dehidrogenáz egyetlen sávként detektáltuk, ami az ily módon tisztított enzim nagy tisztaságát bizonyítja.

25 3. példa

Az enzim tulajdonságai

A 2. példa szerint előállított, tisztított formiát-dehidrogenáz tulajdonságait az alábbiak szerint vizsgáltuk.

Specifikus aktivitás

30 A kapott formiát-dehidrogenáz aktivitását úgy vizsgáltuk, hogy 340 nm-en mértük az abszorpció növekedését, amely a NADH keletkezéséből származott



500 mM nátrium-formiátot és 5 mM NAD-t tartalmazó 0,1 M foszfát pufferben (pH 7) 30 °C-on vagy 40 °C-on. Ebben az összefüggésben az 1 μ mol NADH-t 1 perc alatt eredményező enzimmennyiséget definiáltuk 1 egységnek. A protein vizsgálatot Lowry módszerével hajtottuk végre, standard proteinként BSA-t alkalmazva. A tisztított formiát-dehidrogenáz specifikus aktivitása 7,6 u/mg protein (30 °C-on) vagy 13,3 u/mg protein (40 °C-on).

K_m értékek meghatározása

A K_m értékeket formiátra és NAD-ra az alábbiak szerint határoztuk meg. A formiátra a K_m értéket úgy határoztuk meg, hogy mértük az aktivitást a nátrium-formiát változó koncentrációi alkalmazásával a fenti specifikus aktivitási vizsgálat körülményei között (30 °C, NAD 5 mM), és a K_m értéket a NAD-ra úgy határoztuk meg, hogy a NAD változó koncentrációval mértük az aktivitást a fenti specifikus aktivitási vizsgálat körülményei között (30 °C, nátrium-formiát 500 mM). A 3. és 4. ábrán V jelenti az enzim reakciósebességét, S jelenti a szubsztrát koncentrációját, és az abszcissa metszete a -1/K_m értéket jelenti. A K_m értéket a 3. ábrából a formiátra 1,6 mM-nek, és a 4. ábrából NAD-ra 0,048 mM-nek találtuk.

A működőképesség hőmérséklettartománya és az optimális hőmérséklet

A működőképesség hőmérséklettartományát és az optimális hőmérsékletet is megvizsgáltuk. Az 5. ábra grafikusán mutatja a relatív aktivitást az egyes hőmérsékleteken, a 30 °C-on mért aktivitást 100%-nak véve. A pH-t konstans 7 értéken tartottuk az összes hőmérsékleten. A találmány szerinti enzim jól működött 20 °C és 65 °C között, az optimális hőmérséklet 50 - 60 °C volt.

Működőképesség pH-tartománya és az optimális pH

A működőképesség pH-tartományát és az optimális pH-t is megvizsgáltuk. A 6. ábrán grafikusán mutatjuk az egyes pH-értékeken a relatív aktivitást, a pH 5,6 értéken mért aktivitást 100%-nak véve. A vizsgálat során a hőmérsékletet konstans 30 °C-on tartottuk minden pH értéknél. A találmány szerinti enzim jól működött pH 5,0 - 10,5 tartományban, az optimális pH 5,5 - 9,5 volt.



Hőstabilitás

Megvizsgáltuk a hőstabilitást is. A 7. ábra szerinti grafikont úgy szerkesztettük meg, hogy 0,1 M foszfát pufferben (pH 7) minden egyes hőmérsékleten 10 perc kezelés után meghatároztuk a maradék aktivitást, a 0 °C-on mért aktivitást vettük 100%-nak. A találmány szerinti enzim 50 °C-ot nem meghaladó hőmérsékleteken stabil volt.

pH-stabilitás

Megvizsgáltuk a pH-stabilitást is. A 8. ábra szerinti grafikont úgy szerkesztettük meg, hogy változó pH mellett 30 °C-on 22 órás kezelés után meghatároztuk a maradék aktivitást, a pH 7,5 értéken mért aktivitást 100%-nak véve. A találmány szerinti enzim viszonylag stabil volt pH 4,5 - 9,0 tartományban.

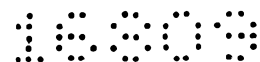
Móltömeg meghatározása

Gélszűrési kromatográfiás meghatározás szerint az enzim móltömege közelítőleg 9×10^4 ($9 \times 10^4 \pm 5 \times 10^3$).

15 4. példa

Formiát-dehidrogenáz gén izolálása

Az 1. példában leírtak szerint tenyésztett *Thiobacillus* sp. KNK65MA sejteket először is lizáltuk, és egy felületaktív szerrel, CTAB-vel, kloroformmal, fenollal vagy hasonlóval extraháltuk, és az extrahált DNS-t izopropil-alkoholból kicsaptuk és centrifugáltuk. Az üledékként kapott DNS-t etanollal mostuk, ily módon kromoszomális DNS-t kaptunk [Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience)]. A kívánt formiát-dehidrogenáz gén előállítására a tisztított formiát-dehidrogenáz amino-terminális aminosav-szekvenciáját gázfázisú protein szekvenátorral vagy hasonlóval meghatároztuk, és a fenti aminosav-szekvencia alapján tervezett, a szekvencialistában 4. számú szekvenciaként azonosított DNS vegyes primer (primer-1) és az ismert formiát-dehidrogenáz gének bázisszekvenciájával nagy homológiát mutató szekvencia alapján tervezett, a szekvencialistában 5. számú szekvenciaként azonosított DNS vegyes primer (primer-2) alkalmazásával elvégeztük a PCR-t, templátként a fentiek szerint kapott kromoszomális DNS



alkalmazásával. A 4., illetve az 5. számú szekvenciaként azonosított szekvenciákban n jelentése adenin, guanin, citozin vagy timin, r jelentése adenin vagy guanin és y jelentése citozin vagy timin. A PCR eredményeként előállítottuk a kívánt formiát-dehidrogenáz gén egy részét. Ezután a kívánt gén teljes hosszának előállítására az előzőekben kapott kromoszomális DNS fragmentet SacI, XbaI, HindIII, ClaI, BamHI, PstI és EcoRI restriktív enzimekkel hasítottuk, majd agaróz gélen elektroforézist végeztünk és Southern hibridizációt hajtottunk végre, szondaként a PCR-rel kapott parciális formiát-dehidrogenáz gén DNS fragmenteinek alkalmazásával. Ennek eredményeként a formiát-dehidrogenáz gént tartalmazó sávot kaptuk, amelyet az EcoRI vagy HindIII hasítás esetében detektáltunk, ami azt mutatta, hogy a formiát-dehidrogenáz gént az alkalmazott restriktív enzim nem hasította, és a formiát-dehidrogenáz gént tartalmazó DNS fragmentek kicsi volt. A fenti DNS fragmentek gélből való kinyerése után T4 DNS-ligázalással ciklizálást végeztünk, és a kapott EcoRI vagy HindIII hasításokból származó DNS-t templátként alkalmazva szintetizáltuk az enzim géntől kifelé irányuló DNS primereket (a szekvencialistában 6., illetve 7. számú szekvenciaként azonosított primer-3, illetve primer-4), a PCR-rel fentiek szerint kapott parciális formiát-dehidrogenáz génnek megfelelő enzim N-terminális és C-terminális végének megfelelő bázisszekvenciák alapján. Ily módon egy külső gén szegmenseket tartalmazó DNS fragmentumot kaptunk, amelyek az előzőleg kapott parciális génben nem voltak jelen. A fenti DNS fragmentum bázisszekvenciájának meghatározása után egy PstI restriktív enzim restriktív helyével kombinált DNS primer (primer-5) alkalmazásával, amelynek szekvenciája megfelel a szekvencialistában 8. számú szekvenciaként azonosított, az enzim N-terminálisát kódoló DNS-től felfelé elhelyezkedő, következtetett bázisszekvenciának, egy EcoRI restriktív enzim restriktív helyével kombinált DNS primer (primer-6) alkalmazásával, amely a szekvencialistában a 9. számú szekvenciaként azonosított, az enzim C-terminálisát kódoló DNS-től lefelé elhelyezkedő következtetett bázisszekvenciának felel meg, a fenti határoló régiók közötti DNS-t PCR-rel felerősítve kaptunk egy DNS fragmentumot (szekvencialistában 2. számú szekvenciaként azonosított szekvencia), amely a formiát-dehidrogenáz gént teljes hosszúságban tartal-



mazta. Az így kapott DNS fragmentum móltömeg meghatározásának és parciális bázisszekvencia analízisének alapján megerősítettük, hogy a fragmentum a formiát-dehidrogenáz gén teljes hosszát tartalmazza (szekvencialistában 3. számú szekvenciaként azonosított szekvencia).

5 5. példa

Formiát-dehidrogenáz gént tartalmazó rekombináns plazmid szerkesztése és a gén analízise

10 A 4. példa szerint előállított formiát-dehidrogenáz gént tartalmazó DNS fragmentumot PstI és EcoRI restriktációs enzimekkel hasítottuk, T4 DNS-ligáz alkalmazásával az ugyenezen enzimekkel hasított pUC19 vektor plazmiddal kombináltuk, így módon kaptuk az 1. ábra szerinti restriktációs enzim térképpel ábrázolt, formiát dehidrogenáz gént tartalmazó rekombináns pFT001 plazmidot. Az 1. ábrán az FDH gén a találmány szerinti formiát-dehidrogenáz gént jelenti.

15 Az így kapott pFT001 plazmid alkalmazásával a 4. példa szerint előállított, PstI és EcoRI helyekkel határolt DNS fragmentum bázisszekvenciáját analizáltuk. Ennek eredményeként kimutattuk a tisztított formiát-dehidrogenázra meghatározott N-terminális aminosav-szekvenciát kódoló bázisok jelenlétét. Ezenkívül meghatároztuk a transzlációs iniciációs helyet is, és a terminációs
20 kodontól lefelé eső szekvencia mint nyílt leolvasási keret alkalmazásával megerősítettük, hogy ez a bázisszekvencia homológ az ismert formiát-dehidrogenáz gén szekvenciájával, és hogy az ezzel kódolt protein megfelel az elektroforézissel meghatározott móltömegnek. Az így kapott, a formiát-dehidrogenáz gént teljes hosszúságában tartalmazó DNS fragmentum bázisszekvenciáját a szekvencialistában 2. számú szekvenciaként azonosított szekvencia
25 mutatja, a nyílt leolvadási keret bázisszekvenciáját a szekvencialistában 3. számú szekvenciaként azonosított szekvencia mutatja, és a bázisszekvenciából következtetett aminosav-szekvenciát a szekvencialistában 1. számú szekvenciaként azonosított szekvencia mutatja.



6. példa

Formiát-dehidrogenáz gént erősen expresszáló rekombináns plazmid szerkesztése

5 A formiát-dehidrogenáz gén N-terminális, illetve C-terminális régióinak NdeI és PstI restriktációs helyekkel való kombinálásával a 4. példa szerint előállított szekvenciával rendelkező primereket (primer-7, primer-8) alkalmazva, amelyek szekvenciáját a 10., illetve 11. számú szekvenciaként azonosított szekvencia mutatja, a köztük lévő DNS PCR-rel történő megsokszorozásával kapjuk azt a nyílt leolvadási keret DNS fragmentumot, amelyet a szekvencialista 10 3. számú szekvenciaként azonosított szekvenciája mutat.

Ezt a DNS fragmentumot NdeI és PstI restriktációs enzimekkel hasítottuk, és DNS ligáz alkalmazásával ugyanezen enzimekkel hasított pUCNT vektor plazmiddal (WO 94/03613) kombinálva megszerkesztettük a pFT002 rekombináns plazmidot, amelyet úgy terveztünk, hogy a formiát-dehidrogenáz 15 gént nagyobb koncentrációban expresszálja, mint a pFT001, és amelyet a 2. ábrán bemutatott restriktációs enzim térkép reprezentál. A 2. ábrán az FDH gén a találmány szerinti formiát-dehidrogenáz gént jelenti.

7. példa

Transzformáns szerkesztése a formiát-dehidrogenáz gént tartalmazó rekombináns DNS alkalmazásával

Az 5. és a 6. példa szerint előállított rekombináns pFT001 és pFT002 plazmidokat kompetens *Escherichia coli* HB101 sejtekkel összekeverve elvégeztük a transzformálást, majd az elegyet a 4. táblázatban bemutatott összetételű agar közegben szélesztve telepek formájában nyertük a formiát-dehidrogenáz gént 25 tartalmazó rekombináns DNS-sel rendelkező *Escherichia coli* HB101 (pFT001) vagy *Escherichia coli* HB101 (pFT002) transzformánsokat.



4. táblázat

Trypton	10 g
Élesztő-extraktum	5 g
NaCl	10 g
Agar	15 mg
Ampicillin	100 mg

A fenti összetételt ionmentes vízzel 1 literre töltöttük fel, pH 7 értékre állítottuk, és autoklávozással sterilizáltuk. Az ampicillint azonban a sterilizálás után adtuk az elegyhez.

A kapott transzformáns telepeket 10 ml folyékony tápközegre oltottuk le, amelynek összetételét az 5. táblázat tartalmazza, és rázatott tenyészetben aerób körülmények között 37 °C-on 20 órán keresztül tenyésztettük.

10

5. táblázat

Trypton	16 g
Élesztő-extraktum	10 g
NaCl	5 g
Ampicillin	100 mg

A fenti összetételt ionmentes vízzel 1 literre töltöttük fel, pH 7 értékre állítottuk, és autoklávozással sterilizáltuk. Az ampicillint azonban a sterilizálás után adtuk az elegyhez.

15 A sejteket a kapott tápközegből centrifugálással összegyűjtöttük, 0,1 M foszfát pufferben (pH 7) szuszpendáltuk, ultrahanggal feltártuk, és centrifugálással eltávolítottuk a sejtől származó oldhatatlan anyagokat, ily módon kaptuk a transzformáns FDH enzimoldatot. A fenti enzimoldat 0,1 ml részét 1,5 ml 1 M



nátrium-formiáttal (pH 7, 0,1 M foszfát pufferben), 0,15 ml 0,1 M NAD-dal és 1,25 ml 0,1 M foszfát pufferrel (pH 7) elegyítettük, és az abszorpció változását 340 nm-en 30 °C-on meghatároztuk. Ennek eredményeként azt találtuk, hogy az abszorpció növekedik az NADH képződése miatt, jelezvén, hogy mindkét transzformáns rendelkezik formiát-dehidrogenáz aktivitással.

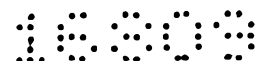
8. példa

A formiát-dehidrogenáz halogénketon toleranciája

A fenti enzim és egyéb FDH-k toleranciáját különféle halogénketon vegyületekkel szemben az alábbiak szerint vizsgáltuk. A 7. példa szerint előállított rekombináns *Escherichia coli* HB101 (pFT002) törzset, amely a pFT002-vel integrált KNK65MA FDH gént tartalmazza, 500 ml-es Sakaguchi lombikban sterilizált 100 ml cseppfolyós tápközegre oltottuk le, amelynek összetételét az 5. táblázat tartalmazza, és rázatva tenyésztettük aerób körülmények között 37 °C-on 20 órán keresztül. A kapott tenyészközeget centrifugálva összegyűjtöttük a sejteket, amelyeket azután 0,1 M foszfát pufferben (pH 6,5) szuszpendáltunk, ultrahanggal roncsoltunk, és centrifugálással eltávolítottuk a sejt-ből származó oldhatatlan anyagokat, ily módon transzformáns FDH enzimoldatot kaptunk.

A KNK607 törzsből (WO 02/46427) származó FDH-t expresszáló rekombináns *Escherichia coli* HB101 (pFA002) törzset hasonló módon tenyésztve kaptuk a transzformáns FDH enzimoldatot. Ezenkívül a *Candida boidinii* (ATCC 32195) törzset 100 ml 1. példában ismertetett tápközegre (pH 6,0) oltottuk, és rázatva tenyésztettük aerób körülmények között 28 °C-on 72 órán keresztül, ily módon is FDH enzimoldatot kaptunk.

A fentiek szerint előállított mindhárom sejtmentes extraktumhoz 1:1 arányban hozzáadtuk a 6. táblázatban összefoglalt különféle halogénketonokat 20 mM koncentrációban (azonban az 1,1-dimetiletal-[(1S)-3-klór-2-oxo-1-(fenilmetil)-propil]karbamátot 2 mM és az 1-(benziloxi)-3-klór-2-propanont 10 mM koncentrációban adtuk hozzá), és az elegyet 30 °C-on 5 órán keresztül állni hagytuk (azonban a 2-klóracetofenon esetén ez az idő 28,5 óra volt), majd a

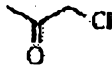
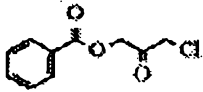
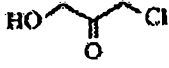


maradék FDH aktivitást meghatározzuk. Az FDH aktivitást a 7. példában ismertetett eljárás szerint vizsgáltuk.

A 6. táblázatból látható, hogy a találmány szerinti enzim nagyon toleráns különféle halogénketon vegyületekkel szemben az egyéb FDH enzimekkel összehasonlítva. A maradék FDH aktivitást a kezelés után kapott százalékos maradék aktivitással fejezzük ki, a kezeletlen sejtmentes extraktum aktivitását 100%-nak véve.

6. táblázat

Halogénketon		Maradék FDH aktivitás (%)		
Képlet	Név	KNK65MA	KNK607	Candida boidinii
	Etil-4-klóracetoacetát	100,7	20,1	14,3
	Etil-4-brómacetoacetát	24,1	0,0	0,0
	Etil-4-jódacetoacetát	12,1	0,0	0,0
	Metil-4-klóracetoacetát	100,0	13,1	14,9
	Etil-2-klóracetoacetát	100,0	2,5	5,4
	2-Klór-1-(3-piridinil)etanon	90,1	6,1	1,5
	1,1-Dimetiletil-[(1S)-3-klór-2-oxo-1-(fenilmetil)propil]karbamát	100,0	81,6	31,3
	2-Klóracetofenon	100,7	100,0	29,4
	2,3'-Diklóracetofenon	97,9	27,0	7,4

	Klóraceton	100,0	46,2	38,2
	1-(Benziloxi)-3-klór- -2-proapnon	100,7	1,6	4,5
	1-Klór-3-hidroxi-2- -propanon	80,1	11,7	14,7

9. példa

Eljárás egy koenzim regenerálására, amely megengedi egy FDH gént tartalmazó rekombináns *Escherichia coli* jelenlétét az etil-4-klóracetoacetát enzimotikus redukciós rendszerében

A 7. példa szerint kapott, KNK65MA-ból származó FDH-t expresszáló *Escherichia coli* HB101 (pFT002) törzset, és a KNK607-ből származó FDH-t expresszáló *Escherichia coli* HB101 (pFT002) törzset (WO 02/46427), 500 ml-es Sakaguchi-lombikban sterilizált 60 ml folyékony tápközegre oltottuk, amelynek összetételét az 5. táblázat mutatja, és 37 °C-on 9 órán keresztül rázatva tenyésztettük. A kapott tenyészközegeket 500 ml-es Sakaguchi-lombikban sterilizált 100 ml 5. táblázat szerinti összetételű cseppfolyós közegre oltottuk 1% mennyiségben, és 37 °C-on 46 órán keresztül rázatva tenyésztettük. A kapott tenyésztőközeget centrifugálással ötszörösére koncentráltuk, és ultrahangos kezeléssel kaptuk az FDH enzimoldatot. Másrésről, egy 4-halogénacetoacetát redukálására reduktáz enzimeként történő alkalmazásra, a rekombináns *Escherichia coli* HB101 (pNTS1M1) (FERM BP--8059) törzset 500 ml-es Sakaguchi-lombikban sterilizált 100 ml 5. táblázatban feltüntetett összetételű tápközegbe inokuláltuk, és 37 °C-on 23 órán keresztül rázatva tenyésztettük, 10-szeresére koncentráltuk, és a sejteket feltártuk. Az FDH enzimoldat fenti ötszörös koncentrátumának 6 ml-jéhez 9,25 ml feltárt HB101 (pNTS1M1) törzset, 25 mg NAD⁺-ot, 1 g nátrium-formiátot és 6 g etil-4-klóracetoacetátot adtunk, majd hozzáadtunk 14,75 ml ioncserélt vizet, és 30



ml butil-acetáttal 60 ml össztérfogatra állítottuk. A pH-t 6,5 értéken tartottuk 5 M vizes hangyasavoldattal, és a reakciót 30 °C-on, keverés közben 3,5 órán keresztül játszottuk le. A reakció befejeződése után a reakcióelegyet butil-acetáttal extraháltuk, és az extraktumot analizáltuk. Abban a rendszerben, ahol a koenzimet a találmány szerinti, KNK65MA-ból származó FDH alkalmazásával regeneráltuk, az etil-4-klór-3-hidroxi-butirát 100% konverziós aránnyal keletkezett. Másrészt a KNK607-ből származó FDH alkalmazásával a rendszerben az etil-4-klór-3-hidroxi-butirát konverziós aránya 26% volt.

Az etil-3-hidroxi-butirát mennyiségi meghatározását gázkromatográfiával végeztük. Eszerint egy PEG-20M Chromosorb WAW DMCS 10%, 80/100 mesh (GL Sciences Inc. terméke) töltetű üvegoszlopon (ID 3 mm x 1 m) végeztük el a kromatográfiát 150 °C-on. A detektálást FID-vel végeztük.

Ipari alkalmazhatóság

A találmány nagy specifikus aktivitással, formiátra és NAD-ra kis K_m értékekkel, széles hőmérséklet- és pH-stabilitással, széles hőmérséklet- és pH-tartományban működőképes és halogénketonokkal szemben nagy toleranciával rendelkező formiát-dehidrogenázt biztosít, amely ily módon ipari alkalmazásra megfelel. A találmány további tárgya a fenti enzimet kódoló gént tartalmazó DNS, egy vektor alkalmazásával megszerkesztett rekombináns DNS, és a fenti plazmid alkalmazásával kapott transzformáns. A találmány továbbá hatékony eljárást biztosít a fenti enzim előállítására, amely érdemi és új tulajdonságokkal rendelkezik, és eljárást egy koenzim regenerálására nagy hatékonysággal, amely megengedi a fenti enzim jelenlétét halogénketon vagy egyéb vegyület enzimátikus redukciós rendszerében.

A szekvencialistában szereplő kötetlen szövegek fordításai

4. szekvencia:

mesterséges szekvencia neve: primer-1

5 n jelentése a 3. pozícióban bármely bázis

n jelentése a 9. pozícióban bármely bázis

n jelentése a 12. pozícióban bármely bázis

5. szekvencia:

mesterséges szekvencia neve: primer-2

10 n jelentése a 6. pozícióban bármely bázis

n jelentése a 15. pozícióban bármely bázis

6. szekvencia:

mesterséges szekvencia neve: primer-3

7. szekvencia:

15 mesterséges szekvencia neve: primer-4

8. szekvencia:

mesterséges szekvencia neve: primer-5

9. szekvencia:

mesterséges szekvencia neve: primer-6

20 10. szekvencia:

mesterséges szekvencia neve: primer-7

11. szekvencia:

mesterséges szekvencia neve: primer-8



Szabadalmi igénypontok

1. Polipeptid, amely halogénketon vegyületekkel szemben toleráns, és formiát-dehidrogenáz aktivitással rendelkezik.
- 5 2. Polipeptid, amely az alábbi fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkezik:
 - (1) hatás: koenzimként NAD-ot alkalmazva a formiátokat oxidálja és széndioxidot termel;
 - (2) móltömeg: körülbelül 9×10^4 ;
 - 10 (3) Km érték formiátra: 1,6 mM;
 - (4) Km érték NAD-ra: 0,048 mM;
 - (5) működőképességének hőmérséklettartománya: 20 °C - 65 °C, optimális hőmérséklet 50 °C - 60 °C;
 - (6) működőképességének pH-tartománya: 5,0 - 10,5, optimális pH 5,5 - 9,5;
 - 15 (7) a stabilitás hőmérséklettartománya: 50 °C fölött nem stabil;
 - (8) a stabilitás pH-tartománya: 4,5 - 9,0.
3. Polipeptid, amely
 - (a) polipeptid, amely a szekvencialistában 1. számú szekvenciaként azonosított aminosav-szekvenciát tartalmazza;
 - 20 (b) polipeptid, amely a szekvencialistában 1. számú szekvenciaként azonosított aminosav-szekvenciából egy vagy több aminosav szubsztitúciójával, inszerciójával, deléciójával és/vagy addíciójával származtatott aminosav-szekvenciát tartalmaz, és formiát-dehidrogenáz aktivitással rendelkezik.
- 25 4. A 2. vagy 3. igénypont szerinti polipeptid, amely halogénketon vegyületekkel szemben toleráns.



5. Az 1 - 4. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid, amely *Thiobacillus* génuszba tartozó mikroorganizmusból származik.
6. Az 5. igénypont szerinti polipeptid, ahol a mikroorganizmus a *Thiobacillus* sp. KNK65MA (FERM BP-7671).
- 5 7. DNS, amely az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti polipeptidet kódolja.
8. DNS, amely
- (c) DSN, amely a szekvencialistában 2. számú szekvenciaként azonosított bázisszekvenciát tartalmazza;
- 10 (d) DNS, amely a szekvencialistában 2. számú szekvenciaként azonosított bázisszekvenciából egy vagy több bázis szubsztitúciójával, inszerciójával, deléciójával és/vagy addíciójával származtatott bázisszekvenciát tartalmaz, és formiát-dehidrogenáz aktivitással rendelkező polipeptidet kódol.
- 15 9. DNS, amely
- (e) DNS, amely a szekvencialistában 3. számú szekvenciaként azonosított bázisszekvenciát tartalmazza;
- (f) DNS, amely a szekvencialistában 3. számú szekvenciaként azonosított bázisszekvenciából egy vagy több bázis szubsztitúciójával, inszerciójával, deléciójával és/vagy addíciójával származtatott bázisszekvenciát tartalmaz, és formiát-dehidrogenáz aktivitással rendelkező polipeptidet kódol.
- 20 10. Rekombináns plazmid, amely a 7 - 9. igénypontok bármelyike szerinti DNS-t tartalmazza.
- 25 11. A 10. igénypont szerinti rekombináns plazmid, ahol a vektor a pUC18, pUC19, pBR322, pACYC184, pSC101 vagy pUCNT.
12. A 10. vagy 11. igénypont szerinti rekombináns plazmid, amely a pFT001.

13. 12. A 10. vagy 11. igénypont szerinti rekombináns plazmid, amely a pFT002.
14. Transzformáns, amely egy gazda mikroorganizmusnak a 10 - 13. igénypontok bármelyike szerinti rekombináns plazmiddal való transzformálásával állítható elő.
15. A 14. igénypont szerinti transzformáns, ahol a gazda mikroorganizmust az alábbi génuszokba tartozó mikroorganizmusok közül választjuk: *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Serratia*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* és *Streptomyces*.
16. A 14. igénypont szerinti transzformáns, ahol a gazda mikroorganizmus az *Escherichia coli*.
17. A 14. igénypont szerinti transzformáns, ahol a gazda mikroorganizmus az *Escherichia coli* HB 101.
18. A 14. igénypont szerinti transzformáns, amely az *Escherichia coli* HB 101 (pFT001) (FERM BP-7672) vagy *Escherichia coli* HB 101 (pFT002) (FERM BP-7673).
19. Eljárás formiát-dehidrogenáz előállítására, **azzal jellemezve**, hogy az 1 - 6. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid termelésére képes mikroorganizmus törzset tenyésztőközegben tenyésztve a fenti polipeptidet hagyjuk termelődni és felhalmozódni, majd begyűjtjük.
20. A 19. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a mikroorganizmus törzs a *Thiobacillus* génuszba tartozik.
21. A 20. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a mikroorganizmus törzs a *Thiobacillus* sp. KNK65MA (FERM BP-7671).
22. Eljárás formiát-dehidrogenáz előállítására, **azzal jellemezve**, hogy a 14 - 18. igénypontok bármelyike szerinti transzformánst tenyésztőközegben tenyésztve a formiát-dehidrogenázt hagyjuk termelődni és felhalmozódni, majd begyűjtjük.



23. Eljárás egy koenzim regenerálására, **azzal jellemezve**, hogy megengedi az 1 - 6. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid, vagy a fenti polipeptid termelésére képes mikroorganizmus törzs, vagy annak feldolgozott anyaga jelenlétét az enzimátikus redukciós reakciórendszerben.

5 24. A 23. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy az enzimátikus redukciós reakció egy halogénketon vegyület enzimátikus redukciós reakciója.

25. A 24. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a halogénketon vegyület egy α -halogénketon vegyület.

10

A meghatalmazott:

DANUBIA

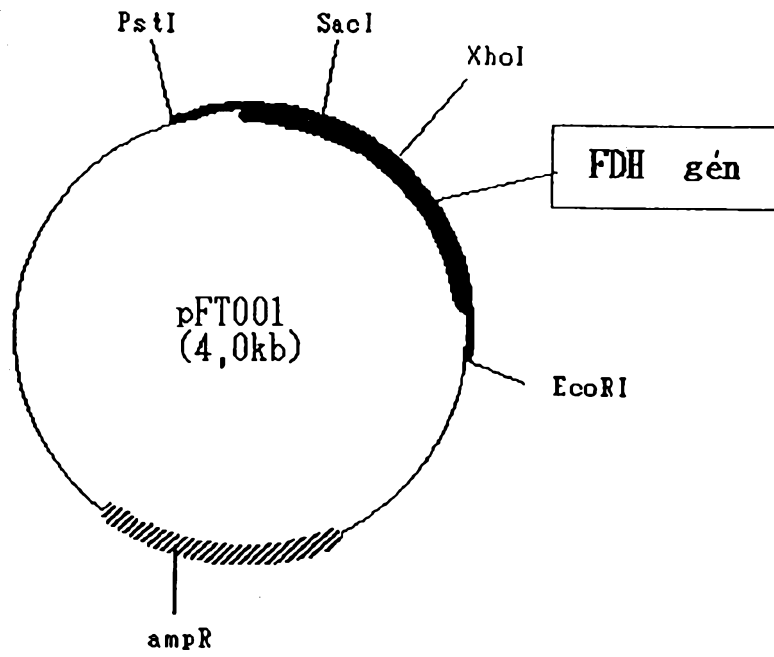
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

15

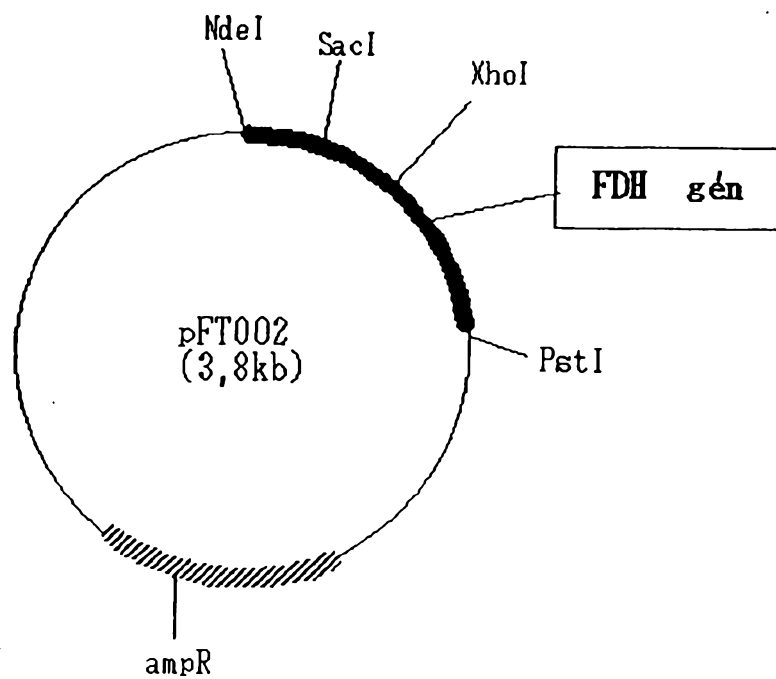
dr. Kiss Ildikó
szabadalmi ügyvivő

20

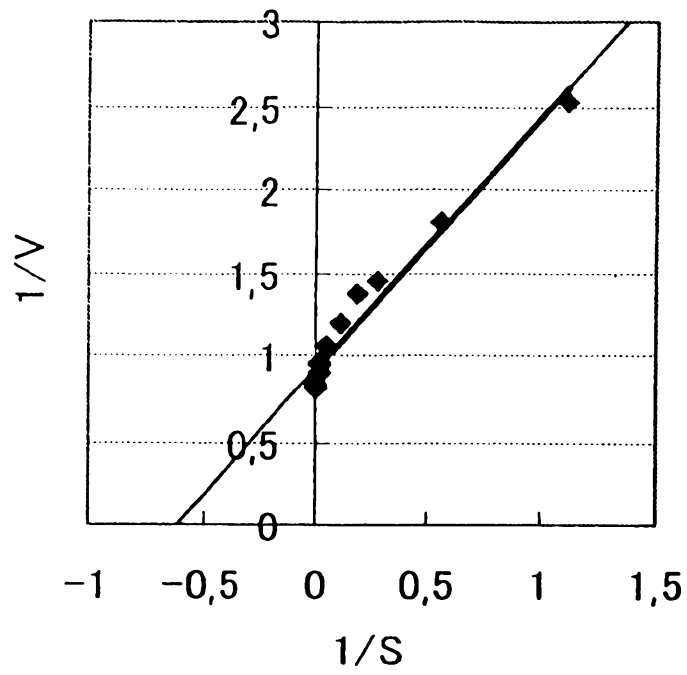
25



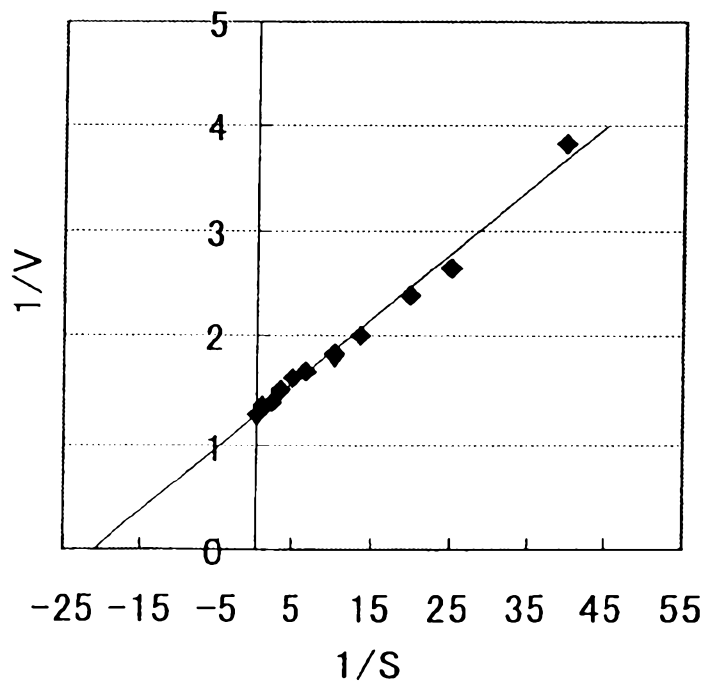
1. ábra



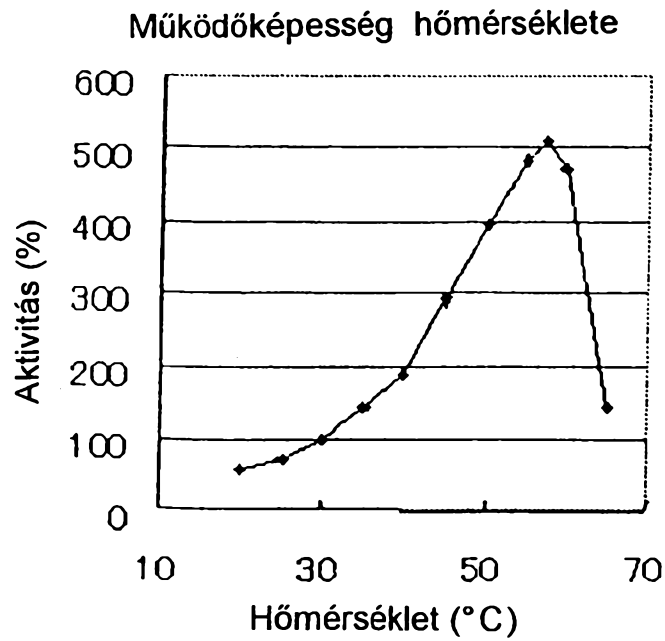
2. ábra



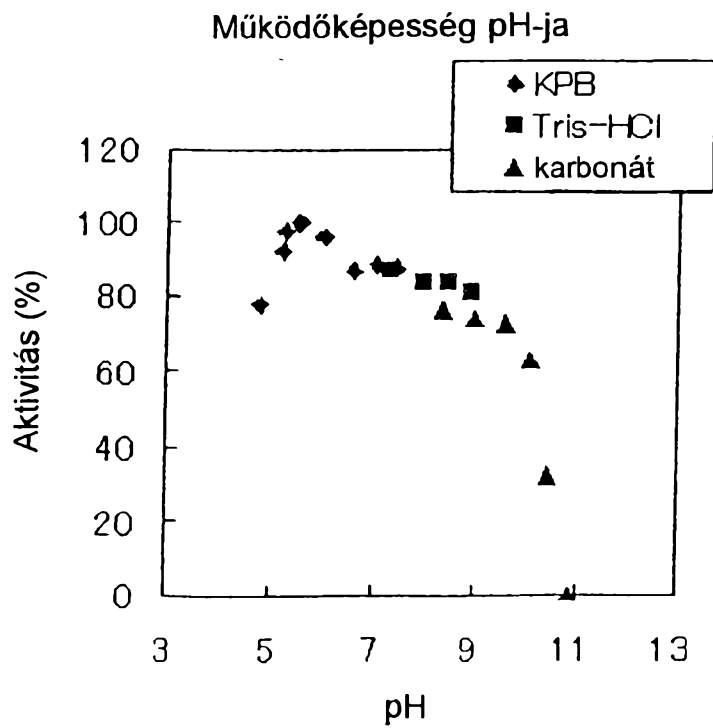
3. ábra



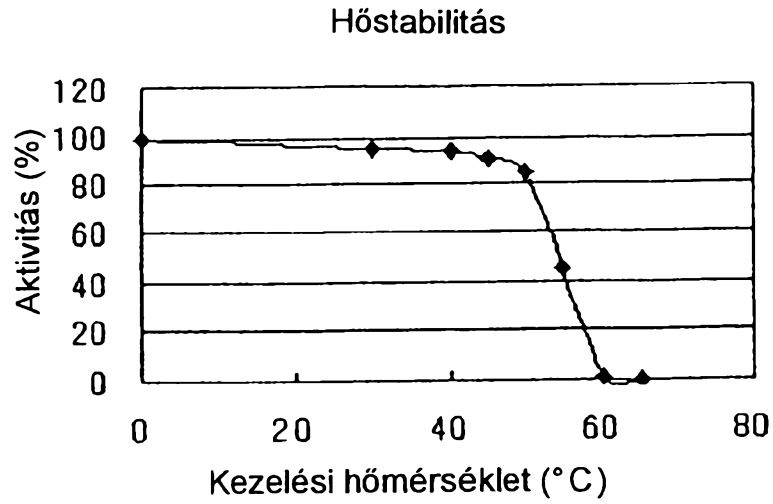
4. ábra



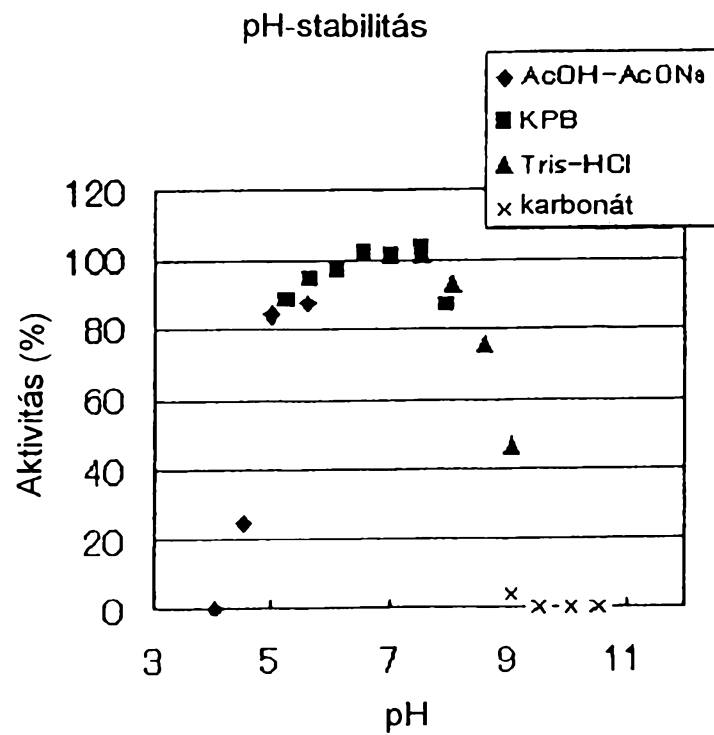
5. ábra



6. ábra



7. ábra



8. ábra