



F 1000104379B



SUOMI - FINLAND  
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS  
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(12) PATENTTIJULKAISU  
PATENTSKRIFT

(10) FI 104379 B

(45) Patenti myönnetty - Patent beviljats

14.01.2000

(51) Kv.lk.7 - Int.kl.7

C12N 15/53, 1/21 ; C12P 7/22, 7/42

(21) Patentihakemus - Patentansökning

895788

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

04.12.1989

(24) Alkupaiva - Löpdag

04.04.1989

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

04.12.1989

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan

PCT/US89/01445

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

05.04.1988 US 177631 P

(73) Haltija - Innehavare

1 •Amgen Inc., 1900 Oak Terrace Lane, Thousand Oaks, CA 91320, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Yen,Kwang-Mu, 422 Raindance Street, Thousand Oaks, CA 91360, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)  
2 •Blatt, Lawrence M., 4715 Vista del Monte, 206 Sherman Oaks, CA 91403, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Kolster Oy Ab  
Iso Roobertinkatu 23, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä ja materiaaleja tolueenin ja muiden fenyylilyhdisteiden biokonvertoimiseksi  
Förfarande och ämnen för biokonversion av toluen och andra fenylföreningar

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism: 67671 ATCC 67672 ATCC

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 289350 (C 02F 3/34), EP A 172506 (C 12N 15/00), US A 4477570 (C 12N 1/20), US A 4520103 (C 12N 15/00),  
Applied and Environmental Microbiology, vol. 53, 1987, p. 949-954, Journal of Biological Chemistry,  
vol. 256, 1981 p. 2723-2730, 85th Annual Meeting of the American Society for Microbiology, 3.-7.3.1985,  
Dissertation Abstracts International, vol. 47, nro 5, 1986, p. 1861-B, Biotechnology, vol. 7, nro 3, maaliskuu 1989, p. 282-285

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Julkistetaan ja vaaditaan patentoitavaksi DNA-geenisegmenttejä, biologisesti funktionaalisia plasmideja ja yhdistelmäplasmideja, ja tällaisia plasmideja sisältäviä mikro-organismi-isäntäsoluja, jotka kaikki sisältävät tolueenimono-oksigenaasigeenejä Pseudomonas mendocina KR-1:stä ja jotka ovat hyödyllisiä menetelmässä valittujen fenyylilyhdisteiden mikrobiaalisen biokonversion valituiksi fenolilyhdisteiksi suoritettamiseksi. Menetelmä on hyödyllinen erityisesti p-hydroksifenyylitikkahapon valmistamiseksi, joka on arvokas kemiallinen välituote tiettyjen antibioottien ja

tiettyjen beta-adrenaliinivaikutusta salpaavien aineiden valmistuksessa.

Uppfinningen avser DNA-gensegment, biologiskt funktionella plasmider och rekombinanta plasmider jämförda mikroorganismvärdceller innehållande dylika plasmider, vilka samtliga innehåller toluenmonooxygenasgener och vilka är användbara vid ett förfarande för mikrobiell biotransformation av valda fenylföreningar till valda fenolföreningar. Förfarande är speciellt användbart för framställning av p-hydroxifenylättiksyra, vilken är en värdefull kemisk mellanprodukt vid framställningen av vissa antibiotika och vissa beta-adrenalinaktiviteten blockerande medel.

Menetelmä ja materiaaleja tolueenin ja muiden fenyylilyhdisteiden biokonvertoimiseksi

#### Keksinnön tausta

5 Kyseinen keksintö koskee yhdistelmä-DNA-tekniikoiden käyttämistä kyvyn valikoituihin biokonversioihin tuottamiseksi mikro-organismi-isäntäsoluille. Spesifisemmin keksintö koskee vasta eristetyistä ja karakterisoidusta Pseudomonas-kannasta Pseudomonas mendocina KR-1 peräisin  
10 olevien tolueenimono-oksyygenaasigeenien kloonausta. Kyseinen keksintö tarjoaa täten geneettisesti manipuloituja mikro-organismeja, jotka tuottavat hyvin runsaasti tolueenimono-oksyygenaasientsyymejä ja -proteiineja, ja tarjoaa näin muodoin aiempaa tehokkaamman keinon tästä entsyymijärjestelmästä riippuvaisten biokonversioiden suorittamiseksi.  
15

Vast'ikään Richardson ja Gibson eristivät Pseudomonas mendocina KR-1:ksi (PmKR1:ksi) identifioidun bakteerin makeavesijärvestä otetusta levämatosta. Whited, Ph.D. -  
20 väitöskirja, The University of Texas, Austin, kirjastoviite n:o W586 (1986). PmKR1 käyttää tolueenia ainoana hiili- ja energialähteenä. Aiemmin on eristetty ja kuvattu muita Pseudomonas-kantoja, jotka metaboloivat tai hajottavat tolueenia, mukaanlukien Pseudomonas putida mt-2 (Pp mt-2).  
25 Williams ja Murry, J.Bacteriol. 120 (1974) 416-423 ja Pseudomonas putida PpF1 (PpF1) (Gibson et.al., Biochemistry 9 (1970) 1626-1630). Kuitenkin näissä eri Pseudomonas-kannoissa tolueenimetabolian geenit, entsyymit sekä reitit ovat erillisiä eivätkä päällekkäisiä.

30 Tolueenihajoamiseen Pp mt-2:n toimesta liittyvä kataboliareitti on nimetty TOL:ksi. TOL-reitin geenit ovat koodautuneet tietyissä Pseudomonas-kannoissa tavattuihin isofunktionaalisiin katabolisiin plasmideihin. TOL-hajoamisreitin malliplasmidi on alunperin Pp mt-2:sta eristetty  
35 pWWO. TOL-reitin genetiikka ja biokemia on perusteellises-

ti kuvattu. Kunz ja Chapman, J.Bacteriol. 146 (1981) 179-191; Williams ja Murry, J.Bacteriol. 120 (1974) 416-423; Williams ja Worsey, J.Bacteriol. 125 (1976) 818-828; Worsey ja Williams, J.Bacteriol. 124 (1975) 7-13; Murry  
 5 et.al., Eur.J.Biochem. 28 (1972) 301-310. Seuraava on lyhyt yhteenveto TOL-reitistä: alustava hyökkäys kohdistuu tolueenin metyyliiryhmään, joka hapettuu perättäisissä vaiheissa muodostaen bentsoehappoa, jonka edelleenhapettuessa muodostuu cis-karboksyylihappodiolia, joka hapettuu muodostaen katekolia, jonka sitten meta-pilkkomisreitintä entsyymit hajottavat asetaldehydiksi ja pyruvaatiksi.

Tolueenin PpF1:n toimesta tapahtuvalle hajoamiselle on selvitetty toinen kataboliareitti, joka on nimetty TOD:ksi. Vastoin kuin TOL-reitissä TOD-reitin geenit sijaitsevat bakteerikromosomissa eivätkä ole koodautuneet plasmidiin. Finette, et.al., J.Bacteriol. 160 (1984) 1003-1009; Finette, Ph.D.-väitöskirja, The University of Texas, Austin, kirjastoviite n:o F494 (1984). TOD-reitin geneetiikkaa ja biokemiaa ovat tutkineet Finette et.al.,  
 15 (supra); Finette (supra); Gibson et.al., Biochemistry 9 (1970) 1626-1630; Kobal et.al., J.Am.Chem.Soc. 95 (1973) 4420-4421; Ziffer et.al., J.Am.Chem.Soc. 95 (1973) 4048-4049; Dagley et.al., Nature 202 (1964) 775-778; Gibson et.al., Biochemistry 7 (1968) 2653-2662. Seuraava on lyhyt yhteenveto TOD-reitistä: alustavan hyökkäyksen tolueenin kimppeun suorittaa dioksygenaasientsyymijärjestelmä, jolloin muodostuu (+)-cis-1(S),2(R)-dihydroksi-3-metyylisykloheksa-3,5-dieeniä (cis-tolueenidihydrodiolia), joka hapettuu 3-metyylikatekoliksi, jonka hajottavat edelleen meta-pilkkomisreitintä entsyymit.  
 25  
 30

Vast'ikään PmKR1:ssä on identifioitu tolueenihajoamiselle kolmas kataboliareitti. On todettu, että PmKR1 hajottaa tolueenia pitkin uutta reittiä, joka eroaa joka suhteessa kummastakin edellä kuvatusta reitistä.  
 35 Richardson ja Gibson, Abst. Ann.Meet. Am.Soc. Microbiol. K54

(1984) 156. PmKR1:n toimesta tapahtuvan tolueenihajoamisen kataboliareitti on nimetty TMO:ksi, koska reitin ensimmäistä vaihetta katalysoi yksittäinen entsyymikompleksi, tolueenimono-oksygenaasi. Tämän reitin entsyymien ja proteiinien biokemiaa on vast'ikään tutkittu yksityiskohtaisesti Whitedin Ph.D.-väitöskirjassa, The University of Texas, Austin, kirjastoviite n:o W586 (1986).

Seuraava on lyhyt yhteenveto TMO-reitistä PmKR1:ssä: ensimmäisenä vaiheena tolueeni hapettuu p-kresoliksi, mitä seuraa metyyliiryhmän hapettuminen, jossa muodostuu p-hydroksibentsoaattia, minkä jälkeen tapahtuu hydroksylaatio protokatekuaatiksi ja sitä seuraava orto-rengaslohkeaminen. TMO-reitin vaiheet Whitedin (supra) hahmotteleman mukaisesti on esitetty kaaviollisesti KUVIOSSA 1. TMO-reitin ensimmäisessä vaiheessa tolueenimono-oksygenaasi muuttaa tolueenin p-kresoliksi. PmKR1 käsittää ainutlaatuisen monikomponenttientsyymijärjestelmän, joka katalysoi tätä ensivaiheen mono-oksygenaasireaktiota. Whitedin (supra) mukaan liittyviä proteiinirakenteita on ainakin kolme: oksygenaasi (ainakin kaksi alayksikköä: 50 000 daltonia ja 32 000 daltonia), ferredoksiini (23 000 d) ja NADH-oksidoreduktaasi (molekyylipainoa ei tunneta).

Tällä hetkellä huolimatta huomattavista edistys-  
 askeleista TMO-reitin entsyymien ja proteiinien biokemian ymmärtämisessä sekä geneettisten tutkimusten aloittamisesta (Yen et.al., tiivistelmä: University of Geneva EMBO Workshop, 31. elokuuta - 4. syyskuuta, 1986) alalla ei ole käytettävissä informaatiota koskien tolueenimono-oksygenaasijärjestelmän PmKR1:ssä entsyymejä ja proteiineja koodaavia geenejä tai tällaisten geenien ja geenituotteiden käyttökelpoisuutta tietyissä mikrobikonversioissa. Alalla ei myöskään ole käytettävissä mikro-organismi-isäntäsoluja, jotka sisältävät PmKR1-tolueenimono-oksygenaasigeenejä sisältäviä uusia yhdistelmäplasmideja, joista mikro-organismi-isäntäsoluista tietyt ilmaisisivat toluee-

nimono-oksygenaasientsyymiaktiivisuutta tasoilla, jotka ylittävät villityypin PmKR1-solujen aktiivisuuden.

#### Keksinnön yhteenveto

5 Kyseinen keksintö tarjoaa uusia geenisegmenttejä, biologisesti funktionaalisia plasmideja ja yhdistelmäplasmideja sekä mikro-organismi-isäntäsoluja, jotka kaikki sisältävät PmKR1-tolueenimono-oksygenaasigeenejä. Kyseinen keksintö tarjoaa edelleen mikro-organismi-isäntäsolun, joka sisältää PmKR1-tolueenimono-oksygenaasigeenejä sisältävän uuden yhdistelmäplasmidin, ja joka isäntäsolu ilmaisee tolueenimono-oksygenaasientsyymiaktiivisuutta tasoilla, jotka ylittävät villityypin PmKR1-solujen aktiivisuuden. Lisäksi kyseinen keksintö tarjoaa menetelmän mikrobi-

10 aalisissa biokonversioissa käytettyjä PmKR1-tolueenimono-oksygenaasigeenejä sisältävien transformoitujen mikro-

15 organismi-isäntäsolujen käyttämiseksi. Täten kyseinen keksintö tarjoaa mikro-organismeja, jotka on geneettisesti manipuloitu tuottamaan hyvin runsaasti tolueenimono-oksygenaasientsyymejä ja -proteiineja, ja se tarjoaa siten aiempaa tehokkaamman keinon tästä entsyymijärjestelmästä riippuvaisten biokonversioiden suorittamiseksi.

20

Kyseinen keksintö käsittää PmKR1:stä saadun ja tolueenimono-oksygenaasigeenejä sisältävän biologisesti funktionaalisen plasmidin. Tämä plasmidi (nimetään "pAUT1") voidaan siirtää konjugoimalla mikro-organismi-isäntäsoluun, josta puuttuu tolueenimono-oksygenaasigeenijärjestelmä ja joka siten ei pysty muuttamaan tolueenia p-kresoliksi. Kyseisen keksinnön erityisen edullisessa suoritusmuodossa pAUT1-plasmidin mikro-organismi-isäntäsolu on Pseudomonas putida Y2101.

25

30

Kyseinen keksintö käsittää myös tolueenimono-oksygenaasigeenit, jotka on eristetty ja kloonattu PmKR1:stä erilaisina DNA-geenisegmentteinä sopivaan, itsenäisesti replikoituvaan plasmidivektoriin, jolloin on saatu sarja yhdistelmäplasmideja, joista kukin sisältää tolueenimono-

35

oksygenaasigeenisegmentin. Kukin tällainen yhdistelmäplasmidi on biologisesti funktionaalinen ja sitä voidaan käyttää mikro-organismi-isäntäsolun transformoimiseksi, jolloin kyseinen mikro-organismi-isäntäsolu saa kyvyn muuttaa tolueenia p-kresoliksi.

5

Kyseinen keksintö käsittää edelleen sarjan tällaisia transformoituja mikro-organismi-isäntäsoluja. Kyseisen keksinnön erityisen edullisessa suoritusmuodossa mikro-organismi-isäntäsolu on E. coli HB101, yhdistelmäplasmidi on pMY402 ja indusori on isopropyylitiogalaktosidi (IPTG). pMY402-yhdistelmäplasmidi on pMMB66EH-plasmidi, johon on insertoitu 4,6 kb:n PmKR1-tolueenimono-oksygenaasigeenejä koodaava XhoI-fragmentti. Kyseisen keksinnön toisessa erityisen edullisessa suoritusmuodossa mikro-organismi-isäntäsolu on E. coli FM5, yhdistelmäplasmidi on pKY287 ja indusorina on lämpö (42°C). pKY287-yhdistelmäplasmidi on pCFM1146-plasmidi, johon on insertoitu 4,6 kb:n PmKR1-tolueenimono-oksygenaasigeenejä koodaava XhoI-fragmentti. Nämä saadut yhdistelmäisäntäsolut ilmaisevat tolueenimono-oksygenaasientsyymiaktiivisuutta tasoilla, jotka ylittävät villityypin PmKR1-solujen aktiivisuuden, joista tolueenimono-oksygenaasigeenit eristettiin.

10

15

20

25

30

Kyseinen keksintö koskee menetelmää tiettyjen mikrobiaalisten biokonversioiden suorittamiseksi käyttäen PmKR1:tä tai PmKR1-tolueenimono-oksygenaasigeenejä sisältäviä transformoitu mikro-organismi -isäntäsoluja, erityisesti valitun fenyyliyhdisteen muuttamiseksi valituksi fenoliyhdisteeksi. Kyseisen keksinnön erityisen edullisena suoritusmuotona tarjotaan menetelmä p-hydroksifenyylietikahapon valmistamiseksi käyttäen PmKR1-tolueenimono-oksygenaasigeenejä sisältäviä transformoitu mikro-organismi -isäntäsoluja.

Kyseinen keksintö koskee myös menetelmää indigon tuottamiseksi mikrobiaalisesti indolista käyttäen PmKR1-

soluja tai PmKR1-tolueenimono-oksygenaasigeenejä sisältäviä transformoitu mikro-organismi -isäntäsoluja.

5 Kyseisen keksinnön muita näkökohtia ja etuja tulee alan ammattilaisille ilmeiseksi heidän tutustuessaan seuraavaan yksityiskohtaiseen kuvaukseen.

Suppea kuvaus piirroksista

Kuvio 1 havainnollistaa PmKR1:n tolueenimono-oksygenaasi- (TMO-) reitin vaiheita.

10 Kuvio 2 esittää karttaa plasmidivektorista pKY235.

Kuvio 3 on yhteenveto yhdistelmäplasmideista ja plasmidivektoreista, jotka sisältävät tolueenimono-oksygenaasigeenejä sisältäviä PmKR1-DNA-segmenttejä, sekä niihin liittyvistä restriktiokartoista.

Yksityiskohtainen kuvaus

15 Menetelmät ja materiaalit, jotka havainnollistavat keksinnön mukaista käytäntöä ja jotka käsittävät tämänhetkiset edulliset suoritusmuodot, liittyvät spesifisesti PmKR1-alkuperää oleviin, plasmidin kantamiin DNA-geenisegmentteihin, jotka koodaavat PmKR1-tolueenimono-oksygenaasientsyymijärjestelmän geenejä. Konjugoimalla tai transformoimalla näitä plasmidin kantamia DNA-geenisegmenttejä voidaan viedä tiettyihin mikro-organismi-isäntäsoluihin ja ilmaista näissä. PmKR1-tolueenimono-oksygenaasigeenejä sisältävät mikro-organismi-isäntäsolut ovat hyödyllisiä

25 menetelmässä tiettyjen biokonversioiden suorittamiseksi.

Keksintöä havainnollistetaan seuraavaksi seuraavilla esimerkeillä oheisiin piirroksiin viitaten. Esimerkkeihin ei sisälly yksityiskohtaisia kuvauksia tavanomaisista menetelmistä, joita käytetään DNA:n eristämiseksi, DNA:n pilkkomiseksi restriktioentsyymeillä, vektorien rakentamiseksi, kiinnostavia polypeptidejä koodaavien DNA-geenisegmenttien insertoimiseksi tällaisiin vektoreihin (esim. plasmideihin) tai saatujen yhdistelmäplasmidien viemiseksi mikro-organismi-isäntäsoluihin. Tällaiset menetelmät ovat

35 geenimanipuloinnin alan ammattilaisten hyvin tuntemia ja

niitä kuvataan lukuisissa julkaisuissa mukaanlukien seuraavat: Maniatis et.al., Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1982); Davis et.al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing Co. (1986); Current Protocols in Molecular Biology, toim. Ausubel et.al., Greene Publishing Associates ja Wiley Interscience (1987).

Esimerkki 1

PmKR1-solujen kasvatus

10 Pseudomonas mendocina KR-1:tä kasvatettiin yön yli 30°C:ssa PAS-kasvualustalla tai PAS-agar-maljalla (Chakrabarty et.al., Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 70 (1973) 1137-1140) lisäten tolueenia (höyrynä) kasvua ja tolueeni-mono-oksygenaasigeenien indusointia silmälläpitäen.

15 Esimerkki 2

PmKR1 BglIII -kirjaston rakentaminen E. coli HB101:een

A. PmKR1-DNA:n valmistus

20 Kokonais-DNA eristettiin PmKR1:stä tavanomaisilla menetelmillä. Lyhyesti, PmKR1:tä siirrostettiin esimerkin 1 mukaiseen tolueenia sisältävään kasvualustaan ja inkuboitiin ravistellen 30°C:ssa yön yli (13-17 tuntia). Inkuboinnin päätyttyä stationäärisessä kasvuvaiheessa olevat PmKR1-solut otettiin sentrifugoimalla talteen. Soluissa  
25 aikaansaatiin lyysi, minkä jälkeen kokonais-PmKR1-DNA uutettiin ja puhdistettiin kuten kuvanneet Dhaese et.al., Nucleic Acid Res. 7 (1979) 1837-1849.

B. Plasmidi-DNA:n valmistus

30 pRK290-plasmidin (Ditta et.al., Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 77 (1980) 7347-7351) sisältävä E. coli HB101 siirrostettiin L-liemeen ja inkuboitiin ravistellen 37°C:ssa yön yli. Bakteerisolot otettiin sentrifugoimalla talteen, niissä aikaansaatiin lyysi ja valtaosa kromosomi-DNA:sta ja solujätteestä poistettiin sentrifugoimalla. pKR290-plasmidi-DNA:ta puhdistettiin sitten tavanomaisten tekni-

35

koiden mukaan käyttäen seesiumkloridi/etidiumbromidi-tiheysgradientteja.

#### C. Yhdistelmäplasmidin valmistus

5 Edellä osassa A saatua kokonais-PmKR1-DNA:ta ja edellä osassa B saatua pRK290-plasmidi-DNA:ta käsiteltiin erikseen restriktioendonukleasilla BglII täydellisen pilkkomisen olosuhteissa. BglII:lla pilkottu PmKR1-DNA sekoitettiin BglII:lla pilkottuun pRK290-plasmidi-DNA:han ja seosta inkuboitiin DNA-ligaasilla.

#### 10 D. Transformointi yhdistelmäplasmidilla

Edellä osassa C saadulla ligatoidulla DNA:lla transformoitiin E. coli HB101:tä ja transformoidut solut maljoitettiin L-agar-valikointimaljoihin, joissa kasvualusta sisälsi 10 mikrogrammaa/ml tetrasykliiniä. Vain ne 15 solut, jotka ovat menestyksekkäästi transformoituneet ja jotka sisältävät pRK290-plasmidin tai yhdistelmä-pRK290-plasmidin, joka sisältää PmKR1-DNA:ta, kykenevät kasvamaan valikointimaljapinnoilla. Valikointimaljapinnoille kasvaaneet pesäkkeet testattiin PmKR1-tolueenimono-oksygenaasi-geenejä sisältävien yhdistelmäplasmidien läsnäolon suhteen 20 esimerkin 3 mukaisella konjugaatio- ja komplementaatioseulontamäärityksellä.

#### Esimerkki 3

Konjugaatio- ja komplementaatioseulontamääritys

25 Esimerkin 2 mukaan valmistetun PmKR1-BglII-kirjaston ja esimerkin 8 mukaan valmistetun PmKR1-SacI-kirjaston seulomiseksi PmKR1-tolueenimono-oksygenaasigeenejä sisältävien yhdistelmäplasmidien toteamiseksi käytettiin komplementaatiomääritystä, joka käsittää plasmidin siirtämisen 30 bakteerikonjugaation välityksellä. Täten plasmideja siirrettiin bakteerikantojen välillä konjugaatio- ("parinmuodustus-") menettelyllä, jota ovat kuvanneet Yen ja Gunsalus, Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 79 (1982) 874-878 ja josta menettelystä on alla esitetty lyhyt yhteenveto.

Esimerkin 2 tai esimerkin 8 mukaisilta valikointimaljoilta irrotettiin pesäkkeitä kevyesti raaputtamalla ja L-lientä käyttäen. Saatu bakteerisoluliete pestiin mahdollisen tetrasykliinin poistamiseksi ja lietettiin L-liemeen

5 parinmuodostusta silmälläpitäen. Luovuttajasoluja, avustajasoluja (mikäli tarpeen) ja vastaanottajasoluja, jotka olivat logaritmisessa kasvuvaiheessa, sekoitettiin lietteinä samat tilavuudet. Pieniä seoseriä maljoitettiin L-agar-maljoihin, joissa siis kaikki solutyypit kykenivät

10 kasvamaan. Yön kestäneen inkuboinnin 30°C:ssa jälkeen solut maljoitettiin edelleen PAS-agar-valikointimaljoihin, joissa kasvualusta sisälsi 50 mikrogrammaa/ml tetrasykliiniä. Kasvun ainoaksi hiililähteeksi tarjottiin tolueenia. Tolueenihöyryä johdettiin valikointimaljaan kiinnittämällä

15 teipillä maljan kanteen tolueenia sisältävä putki, jonka pää oli tilkitty vanulla. Tässä valikointimaljassa kykenevät kasvamaan vain halutut transkonjugaatit. Kaikissa suoritetuissa kokeissa luovuttajasolut olivat E. coli HB101 -kirjastosta (joko esimerkin 2 mukainen BglII-kirjasto tai esimerkin 8 mukainen SacI-kirjasto), joka käsitteää parinmuodostuksessa siirrettävän yhdistelmäplasmidin (pRK290 tai pKY235, joka sisältää PmKR1-geenisegmenttejä).

20 Käytetyt avustajasolut olivat E. coli HB101 -soluja, jotka sisälsivät avustajaplasmidin pRK2013, joka plasmidi varusti tra-geenejä ei-sisältävät siirtoplasmidit siirtofunktiolla. Vaihtoehtoisesti avustajaplasmidi pRK2013 vietiin suoraan luovuttajasoluihin siirtofunktion tuottamiseksi tälle. Vastaanottajakanta oli jokin useista Pseudomonas mendocina KR-1 -mutanttikannoista (PmY4001, PmY4002, PmY4007), jotka valmistettiin kuten kuvattu esimerkissä 4.

25 Kunkin mutanttikannan tolueenimono-oksyygenaasigeeni on puutteellinen eikä kanta kykene muuttamaan tolueenia p-kresoliksi. Sitten kun yhdistelmäplasmidi, joka sisältää vastaanottajakannassa puutteellisen spesifisen PmKR1-tolueenimono-oksyygenaasigeenin, on menestyksekkäästi siir-

30

35

retty konjugoimalla, saatu transkonjugaatti kykenee muodostamaan pesäkkeen tolueenia kasvun ainoana hiililähteenä sisältävään valikointimaljaan.

5 Valikointimaljapinnoille kasvaneita pesäkkeitä puhdistettiin viivasiirrostaamalla jokainen pesäke kerran tai kahdesti valikointimaljaan. Näitä transkonjugaatteja manipuloidaan edelleen esimerkin 5 mukaan.

#### Esimerkki 4

10 Pseudomonas mendocina KR-1 -mutanttikantojen valmistus

PmKR1-soluja mutatoitiin ja tolueenimono-oksygenaasin osalta puutteelliset mutantit eristettiin seuraavan menettelyjärjestelyn mukaan. Soluja kasvatettiin 5 ml:ssa L-lientä optiseen tiheyteen 660 nm:n aallonpituudella (O.D.<sub>660</sub>) noin 0,7, minkä jälkeen ne uudelleenlietettiin 15 2 ml:aan 50 mM sitraattipuskuria, pH 6,0, joka sisälsi N-metyyli-N'-nitro-N-nitrosoguanidiinia (nitrosoguanidiinia) pitoisuuden 0,2 mg/ml. Soluja inkuboitiin huoneen lämpötilassa 20 minuutin ajan, minkä jälkeen ne pestiin kahdesti 20 2 ml:lla 1 M fosfaattipuskuria, pH 7,0, ja uudelleenlietettiin 50 ml:aan L-lientä. Soluja kasvatettiin yön yli, minkä jälkeen niitä viivasiirrostettiin L-agarmaljoihin yksittäispesäkkeiden saamiseksi. Yksittäiset pesäkkeet noukittiin talteen ja viivasiirrostettiin PAS-maljoihin, 25 joissa kasvualusta sisälsi tolueenia tai p-kresolia ainoana hiililähteenä. Tolueenimono-oksygenaasin osalta puutteelliset mutantit, PmY4001, PmY4002 ja PmY4007 eristettiin kantoina, jotka kasvoivat p-kresolilla mutta eivät tolueenilla. Esimerkissä 11 kuvatun mukaisella tolueenimono-oksygenaasimäärityksellä varmistettiin edelleen, että 30 näiden mutanttien tolueenimono-oksygenaasientsyymijärjestelmä on puutteellinen.

35 Samankaltaisia mutatointitekniikoita käyttämällä voidaan saada mutanteja, jotka on puutteellisia TMO-reitientsyymien p-hydroksibentsaldehydidehydrogenaasi suhteen.

Kun PmKR1-soluja on käsitelty nitrosoguanidiinilla edellä kuvatun mukaisesti, p-hydroksibentsaldehydidehydrogenaasin osalta puutteelliset mutantit eristetään kantoina, jotka kasvavat p-hydroksibentsoaatilla, mutta eivät kasva to-  
5 lueenilla, p-kresolilla, p-hydroksibentsyylialkoholilla tai p-hydroksibentsaldehydillä.

Esimerkki 5

9,4 kb:n BglIII-fragmentin eristys

Useita (12) esimerkin 3 mukaaan eristettyjä, PmKR1-  
10 tolueenimono-oksygenaasigeenejä sisältäviä PmY4001-trans-  
konjugaattipesäkkeitä karakterisoitiin edelleen seuraavas-  
ti. Kukin pesäke kasvatettiin ja plasmidi-DNA eristettiin  
tavanomaisilla menetelmillä. Kustakin isolaatista saadulla  
plasmidi-DNA:lla transformoitiin E. coli HB101 -soluja.  
15 Kunkin transformantin käsittämä plasmidi siirrettiin  
PmY4001:een konjugoimalla esimerkin 3 mukaan lukuunotta-  
matta, että valikointimaljat sisälsivät tetrasykliiniä ja  
glukoosia (2 mg/ml). Kunkin transkonjugaatin kasvua to-  
lueenilla testattiin maljoittamalla solut PAS-agarille,  
20 jota oli täydennetty 50 mikrogrammalla/ml tetrasykliiniä  
sekä jota täydennettiin tolueenihöyryllä. Sitten kun oli  
varmistuttu plasmidin tolueenimono-oksygenaasia komplemen-  
toivasta aktiivisuudesta transkonjugaateissa, kutakin  
tällaista HB101-transformanttia kasvatettiin ja plasmidi-  
25 DNA eristettiin tavanomaisilla menetelmillä.

DNA:ta pilkottiin BglII:lla ja kustakin transkonju-  
gaattipesäkkeestä eristettiin 9,4 kb:n fragmentti, joka  
komplementoi kutakin esimerkin 4 PmKR1-mutanttikantaa  
tolueenin käytön osalta. Tämä tulos osoitti, että  
30 PmKR1:stä peräisin oleva 9,4 kb:n BglII-fragmentti sisälsi  
yhden tai useamman tolueenimono-oksygenaasigeenin. Kaksi  
SacI-keskusta paikannettiin kartassa lähelle 9,4 kb:n  
BglII-fragmentin toista päätyä.

35

Esimerkki 6pKY235-plasmidivektorin rakentaminen

Lähtömateriaalina pKY235-plasmidin rakennuksessa oli plasmidi pKY217, jota ovat kuvanneet Yen ja Gunsalus, 5 J.Bacteriol. 162 (1985) 1008-1013. pKY235-plasmidi rakennettiin seuraavan vaihesarjan mukaan. Ensimmäisessä vaiheessa nahR- ja nahG-geenit sisältävä 5,1 kb:n HindIII-fragmentti pKY217:stä kloonattiin pKT240-plasmidin HindIII-keskukseen, jota plasmidia ovat kuvanneet 10 Bagdasarian et.al., Gene 26 (1983) 273-282. Tästä ensimmäisestä vaiheesta saatu plasmidi nimettiin pKY219:ksi. Toisessa vaiheessa nahR- ja nahG-geenit sisältävä noin 7 kb:n BamHI-SacI-fragmentti pKY219:stä kloonattiin pKT231-plasmidin BamHI- ja SacI-keskuksiin, jota plasmidia kuvaavat 15 Bagdasarian et.al., Gene 16 (1981) 237-247. Saatu plasmidi nimettiin pKY223:ksi. Seuraavassa vaiheessa nahR-geenin, 200 emäsparia nahG-geenistä sekä kanamysiiniresistenssin tuottavan geenin sisältävä 6 kb:n PstI-fragmentti pKY223:sta kloonattiin pUC19-plasmidin PstI-keskukseen, 20 jota plasmidia kuvaavat Yanisch-Perron et.al., Gene 33 (1985) 103-119. Saatu plasmidi nimettiin pKY256:ksi. 6 kb:n PstI-fragmentin suuntautuminen pKY256:ssa osoitti pUC19:n monikloonauskeskuksen SalI-keskuksesta EcoRI-keskukseen paikaksi välittömästi alavirtaan PstI-keskuksesta 25 nahG-geenissä. Viimeisessä vaiheessa kanamysiiniresistenssin tuottavan geenin, nahR-geenin, 200 emäsparia nahG-geenistä sekä monikloonauskeskuksen sisältävän 5,4 kb:n BstEII-EcoRI-fragmentin pKY256:sta pääty täytettiin E. coli DNA-polymeraasi-I:n suurella fragmentilla, minkä 30 jälkeen ensinmainittu fragmentti insertoititiin Dittan et.al., Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 77 (1980) 7347-7351, kuvaamaan pRK290-plasmidiin korvaamaan pRK290:n noin 1 kb:n SmaI-fragmentti. Saatu plasmidi nimettiin pKY235:ksi, ja siitä on esitetty kartta kuviossa 2.

35

Esimerkki 7

## pCFM1146-plasmidivektorin rakentaminen

Lähtömateriaalina pCFM1146-plasmidin rakennuksessa oli plasmidi pCFM836. Yksityiskohtainen kuvaus ilmaisuvektorien, mukaanlukien pCFM836:n, rakentamisesta on esitetty US-patenttijulkaisussa 4,710,473, joka täten sisällytetään kokonaisuudessaan tähän viitteeksi. pCFM836-plasmidi sisältää lämpöindusoituvan promoottorin, restriktiokeskuspankin (kloonausrykelmän), plasmidin replikaation alkukohdan, transkription päättäjän, plasmidin kopiolukua säättäviä geenejä sekä kanamysiiniresistenssin tuottavan geenin, mutta ei sisällä kloonausrykelmää välittömästi edeltävää synteettistä ribosomisitoutumiskeskusta. pCFM1146-plasmidi saatiin pCFM836:sta korvaamalla pieni yksittäisten ClaI- ja XbaI-restriktiokeskusten välinen DNA-sekvenssi seuraavalla oligonukleotidilla:

```

5' CGATTTGATT          3'
3' TAAACTAAGATC      5'

```

sekä tuhoamalla läsnäolevat kaksi endogeenistä NdeI-restriktiokeskusta NdeI:llä pilkkomalla, täyttämällä sitten T<sub>4</sub>-polymeraasientsyymillä sekä lopuksi tylppäpäätty-ligatomalla.

Esimerkki 8PmKR1-SacI-kirjaston rakentaminen E. coli HB101:een

Esimerkin 6 mukaan valmistettua pKY235-plasmidivektoria käyttäen rakennettiin SacI-kirjasto E. coli HB101:een tavanomaisten tekniikoiden genomikirjastojen rakentamiseksi mukaan. PmKR1:stä eristettiin kokonais-DNA kuten kuvattu esimerkissä 2, osa A. Eristettyä PmKR1-DNA:ta käsiteltiin restriktiendonukleaasilla SacI osittaispilkkomisolosuhteissa. DNA-fragmenttipopulaation saamiseksi, joka olisi rikastunut niiden fragmenttien suhteen, jotka sisältävät joitakin PmKR1-tolueenimono-oksigeenaigeenejä tai kaikki nämä geenit, käytettäväksi tämän SacI-kirjaston rakentamiseksi osittain pilkottu PmKR1-DNA

fraktioitiin koon perusteella tavanomaisilla menettelyillä 10 % - 40 % -sakkaroositiheysgradienttia käyttäen. DNA-fraktiot otettiin talteen sentrifugoimalla 24 tunnin ajan 26 000 kierr./min. kierrosnopeudella SW-28-sentrifugiputkissa ja -roottorilla, minkä jälkeen niitä testattiin 5 hybridoidimalla. 9,4 kb:n BglII-fragmentti, joka eristettiin esimerkin 2 mukaan rakennetusta BglII-kirjastosta ja jonka tiedettiin esimerkin 5 mukaan komplementoivan tolueenin käytön osalta kaikkia PmKR1-mutanttikantoja ja joka siten 10 oletettavasti sisältäisi ainakin yhden PmKR1-tolueenimono-oksyygenaasigeeneistä, leimattiin radioaktiivisella leimalla, minkä jälkeen sitä koettimena käyttäen valikoitiin sakkaroosigradianttituotteesta hybridoituvia fraktioita. Hybridoituvat fraktiot yhdistettiin pooliksi DNA-fragmenttipopulaation saamiseksi, joka on rikastunut PmKR1-tolueenimono-oksyygenaasipitoisten fragmenttien suhteen. Tätä rikastettua DNA-fragmenttipopulaatiota käyttäen rakennettiin 15 SacI-kirjasto.

Rikastettu SacI:llä pilkottu PmKR1-DNA sekoitettiin 20 SacI:llä pilkottuun pKY235-plasmidi-DNA:han ja inkuboitiin DNA-ligaasilla. Ligatoidulla DNA:lla transformoitiin E. coli HB101 ja transformoituneet solut maljoitettiin L-agar-valikointimaljoihin, joissa kasvualusta sisälsi 10 mikrogrammaa/ml tetrasykliiniä. Valikointimaljapinnoilla 25 kykenevät kasvamaan vain menestyksekkäästi transformoidut sekä pKY235-plasmidin tai yhdistelmä-pKY235-plasmidin, joka sisältää PmKR1-DNA:ta, sisältävät solut. Transformanttipesäkkeitä testattiin PmKR1-tolueenimono-oksyygenaasigeenien suhteen esimerkin 3 mukaisella konjugaatio- ja 30 komplementaatiomäärityksellä.

#### Esimerkki 9

20,5 kb:n SacI-fragmentin eristys

Useita (10) tolueenia ainoana hiililähteenä käyttäviä transkonjugaatteja karakterisoitiin edelleen eristämällä plasmidi-DNA, transformoimalla sillä E. coli HB101 35

sekä konjugoimalla PmY4001:een kasvun tolueenilla suhteen testaamiseksi esimerkin 5 mukaan. E. coli HB101 -transformantia, joka sisälsi tolueenimono-oksygenaasigeenejä sisältävän yhdistelmä-pKY235-plasmidin (nimettiin pKY266:ksi), kasvatettiin ja plasmidi-DNA eristettiin tavanomaisten menetelmien mukaan. pKY266-plasmidi-insertin restriktioentsyymianalyysi osoitti insertin sisältävän kaksi SacI-fragmenttia, 10,2 kb:tä ja vastaavasti 10,3 kb:tä. 10,2 kb:n SacI-fragmentti sisältää 8 kb:tä esimerkiksi 5 kuvattua 9,4 kb:n BglII-fragmenttia.

#### Esimerkki 10

Yhdistelmäplasmidien rakentaminen tolueenimono-oksygenaasigeenien kartoittamiseksi

pKY266:n 10,2 kb:n SacI-fragmentti alakloonattiin edelleen korkean kopioluvun omaavaan E. coli -ilmaisuvektoriin pUC19, jota kuvaavat Yanisch-Perron *et.al.*, Gene 33 (1985) 103-119, ja saatu yhdistelmäplasmidi nimettiin pKY277:ksi. pKY277-plasmidilla transformoitiin E. coli JM109 -soluja. Tämä uusi, JM109/pKY277:ksi nimetty E. coli -kanta syntetisoi L-liemessä sinistä pigmenttiä, joka omasi indigolle tyypillisiä ominaisuuksia. Tällä kannalla todettiin myös tolueenimono-oksygenaasiaktiivisuutta. Tolueenimono-oksygenaasigeenien lisäkartoitus yhdisti indigoa tuottavan ominaisuuden tolueenimono-oksygenaasiaktiivisuuden läsnäoloon. (Katso taulukko I).

pKY277:n 10,2 kb:n SacI-fragmenttia pilkottiin joukolla restriktioentsyymejä ja muodostettiin kuviossa 3 esitetyn mukainen osittainen restriktiokartta. Tämän restriktiokartan nojalla 10,2 kb:n SacI-fragmentin pKY277:ssä toisesta päädyistä poistettiin joukko DNA-fragmentteja, jolloin saatiin kuviossa 3 esitetyt plasmidit pKY280, pKY281, pKY282 ja pKY283. Alakloonaamalla 4,6 kb:n XhoI-fragmentti pKY282:sta pUC19:n SalI-keskukseen saatiin plasmidi pMY401. 4,6 kb:n XhoI-fragmentin sisältävä 4,6 kb:n BamHI-SphI-fragmentti pMY401:stä insertoitiin

Yanisch-Perronin et.al., Gene 33 (1985) 103-119, kuvaamaan E. coli -ilmaisuvektoriin pUC18, jolloin saatiin plasmidi pMY404. pUC18-plasmidi on pUC19:ään nähden identtinen lukuunottamatta, että monikloonauskeskus on suuntautunut

5 lac-promoottoriin nähden vastakkaisesti. Seurauksena tästä 4,6 kb:n XhoI-fragmentti insertoitui pUC18-plasmidiin suuntauksen lac-promoottoriin osalta pUC19-plasmidiin nähden vastakkaisesti. pKY277:n 4,6 kb:n XhoI-fragmentti kloonattiin myös laajan isäntävalikoiman omaavaan plasmi-

10 divektoriin pMMB66EH, jota kuvaavat Furste et.al., Gene 48 (1986) 119-131, plasmidin pMY402 rakentamiseksi. Lisäksi kuten esitetty kuviossa 3 pKY282:n 5,9 kb:n SacI-XmaI-fragmentin vasemmasta päädyistä poistettiin 2,2 kb:n SacI-BglII-fragmentti pilkkomalla pKY282-DNA:ta SacI:llä ja

15 BglII:lla, täyttämällä päädyt E. coli DNA-polymeraasi-I:n suurella fragmentilla sekä ligatoimalla päädyt. Saatu plasmidi nimettiin pMY400:ksi.

Kuten esitetty taulukossa I (esimerkin 11 määrityksen mukaisesti) pMY402:n sisältävät solut reagoivat

20 IPTG:hen tolueenimono-oksygenaasigeenien indusoinnissa. Tämä tulos paikansi tolueenimono-oksygenaasigeenit 4,6 kb:n XhoI-fragmenttiin ja paljasti tolueenimono-oksygenaasigeenien transkription suunnaksi vasemmalta oikealle kuten esitetty kuviossa 3. Erot 4,6 kb:n XhoI-fragmentin suun-

25 tauksessa pMY401:ssä ja pMY404:ssä sekä tolueenimono-oksygenaasiaktiivisuudessa pMY401:n ja pMY404:n sisältävissä soluissa (taulukko I) sopivat samoin loogisesti yhteen tolueenimono-oksygenaasigeenien juuri tämän transkriptio-

suunnan kanssa. Tolueenimono-oksygenaasigeenien ilmaisemiseksi korkealla tasolla pKY282:n 4,6 kb:n XhoI-fragmentti kloonattiin myös E. coli -ilmaisuvektorin pCFM1146 XhoI-keskukseen (kuten kuvattu esimerkissä 7) pKY287:n rakenta-

miseksi.

35

Esimerkki 11

## Tolueenimono-oksyygenaasimääritys

Soluja kasvatettiin 0,4 % glutamaattia sisältävässä PAS-kasvualustassa tai L-liemessä kyllästyspisteeseen. Ne uudelleenlietettiin sopivaan tilavuuteen samaa kasvualustaa pitoisuudeksi, joka vastasi optista tiheyttä 3,0 660 nm:n aallonpituudella. Näyte-erä soluja käytettiin proteiinipitoisuuden määrittämiseksi Bradfordin menetelmällä, Anal.Biochem. 72 (1976) 248, Bio-Rad -proteiinimääritystä käyttäen. 0,5 ml:n erä soluja sekoitettiin 4 mikromooliin p-kresolia 10 mikrolitrassa ja 15 nanomooliin radioaktiivista tolueenia (tolueenirengas-<sup>14</sup>C, Sigma Chemical Co., 56,3 mCi/mmol) 5 mikrolitrassa ja seosta inkuboitiin huoneen lämpötilassa silloin tällöin vortex-sekoittajalla sekoittaen 20 minuutin ajan. Inkuboinnin päätyttyä 20 mikrolitraa seosta sijoitettiin täpliksi pienelle palaselle ohutkerroskromatografialevyä, minkä jälkeen levyä kuivattiin ilmassa 20 minuutin ajan. Suodattimelle jäänyt ei-haihtuva radioaktiivisuus määritettiin nestetuikelaskijalla ja siitä laskettiin levyn käsittämän tolueenihajoamistuotteen määrä ja tolueenimono-oksyygenaasin spesifinen aktiivisuus. Tulokset on esitetty taulukossa I.

25

30

35

## Taulukko I

Tolueenimono-oksigenaasi- (TMO-) geenien ilmaisu E. colissa ja P. mendocinassa

5

	<u>Plas-</u> <u>midi</u>	<u>Indusori</u>	<u>Isäntäsolu</u>	<u>TMO:n spesi-</u> <u>finen aktii-</u> <u>visuus</u> (nmole min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )	<u>Indinen</u> <u>muodostus</u>
10	pAUT1	tolueeni	<u>E. mendocina</u> KR1	0.130	+
	pAUT1	-	<u>E. mendocina</u> KR1	0.010	+
	pKY266	-	<u>E. putida</u> KT2440	0.020	+
	pKY277	-	<u>E. coli</u> JM109	0.010	+
	pMY405	-	<u>E. coli</u> HB101	0.005	-
	pMY405	IPTG	<u>E. coli</u> HB101	0.015	+
	pKY280	-	<u>E. coli</u> JM109	0.010	+
15	pKY281	-	<u>E. coli</u> JM109	0.010	+
	pKY282	-	<u>E. coli</u> JM109	0.010	+
	pKY283	-	<u>E. coli</u> JM109	0.005	-
	pMY400	-	<u>E. coli</u> JM83	0.005	-
	pMY401	-	<u>E. coli</u> JM83	0.035	+
	pMY404	-	<u>E. coli</u> JM83	0.010	+
	pMY402	-	<u>E. coli</u> HB101	0.005	-
	pMY402	IPTG	<u>E. coli</u> HB101	0.200	+
20	pMY287	lämpö	<u>E. coli</u> FM5	0.500	+
	pUC19	-	<u>E. coli</u> JM109	0.005	-
	pMMB66EH	IPTG	<u>E. coli</u> HB101	0.005	-
	pFCM1146	lämpö	<u>E. coli</u> FM5	0.005	-

## Esimerkki 12

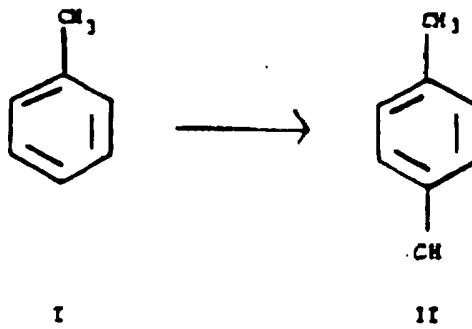
25 Tiettyjen fenyyliyhdisteiden muuttaminen tietyiksi fenoliyhdisteiksi

## A. Muuttaminen PmKR1-soluilla

30 Monet fenyyliyhdisteet, mukaanlukien tolueeni, metyyli-fenyylietikkahappo, etyyli-fenyylietikkahappo, 2-fenyylietanoli, asetanilidi, fluoribentseeni ja etyyli-bentseeni, voivat toimia PmKR1:n tolueenimono-oksigenaasi-järjestelmän substraatteina ja siten tulla para-hydroksyloinnin kautta muutetuiksi sen toimesta fenoliyhdisteiksi. Seuraava kaavio havainnollistaa useita mahdollisia konver-

35 sioita:

5



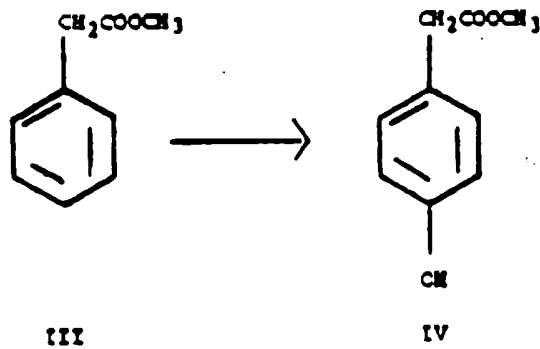
jossa:

10

I on tolueni

II on p-kresoli

15



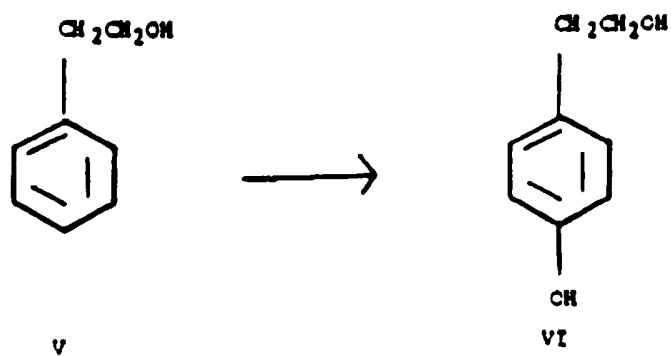
20

jossa:

III on metyylifenyylietikkahappo

IV on p-hydroksimetyylifenyylietikkahappo

25



30

jossa:

V on 2-fenyylietanoli

35

VI on p-hydroksi-2-fenyylietanoli

Kutakin konversiota varten fenyyliyhdistesubstraattia (esimerkiksi kaavan I, III tai V mukaista) sekoitettiin PmKR1-soluihin ja inkuboitiin riittävän pitkän ajan biokonversion aikaansaamiseksi, minkä jälkeen fenolihdisteiden läsnäolo määritettiin seuraavasti.

5            Pseudomonas mendocina KR-1 -soluja kasvatettiin 25-30°C:ssa 50 ml:ssa PAS-kasvualustaa, jota oli täydennetty 0,4 %:lla glutamaattia, stationääriseen kasvuvaiheeseen (12-16 tunnin ajan) 2,5 ml:sta tolueenia peräisin olevan  
10            tolueenihöyryn läsnäollessa (indusoitu) tai puuttuessa (ei-indusoitu). 5-50 ml:n erä soluja uudelleenlietettiin samaan tilavuuteen samaa kasvualustaa tai konsentroitiin 2,5x samassa kasvualustassa. Soluihin sekoitettiin subst-  
15            raattia tietty määrä niin, että muodostui 15-30 mM liuos, ja seosta inkuboitiin 25-30°C:ssa kiivaasti ravistellen 1-24 tunnin ajan. Tyypillisesti seosta inkuboitiin 5-6 tunnin ajan. Fenolihdisteiden muodostuminen määritettiin Guptan et.al., Clin.Biochem. 16:4 (1983) 220-221, analyysimenetelmän mukaan. Taulukossa II on esitetty analyysitulokset useammam fenyyli-substraatin konversiolle fenolihdisteeksi eri inkubointiajoilla ja -lämpötiloissa.

25

30

35

Taulukko II

Fenoliyhdisteiden synteesi Pseudomonas mendocina  
KR-1 -tolueenimono-oksyygenaasilla

5	<u>Substraatti (inkubointiaika ja</u> <u>-lämpötila)</u>	<u>Analyysin</u>	
		<u>O.D.<sub>660</sub></u>	<u>-lukema</u>
	asetanilidi (6 tuntia, 25°C)	1,07	
10	fluoribentseeni (24 tuntia, 25°C)	0,73	
	metyylifenyyliasetaatti (6 tuntia, 30°C)	0,23	
	etyylifenyyliasetaatti (6 tuntia, 30°C)		0,13
	etyylibentseeni (6 tuntia, 30°C)	0,37	
	2-fenyylietanoli (5 tuntia, 30°C)	0,16	
15	substraatti ei-indusoidussa viljelmässä	0,03	

B. Konversio mikro-organismi-isäntäsoluilla, jotka sisältävät PmKR1-tolueenimono-oksyygenaasigeenejä koodaavia yhdistelmäplasmideja

- 20 Samat osan A mukaiset konversiot voidaan aikaansaada käyttämällä mikro-organismi-isäntäsoluja, jotka sisältävät esimerkin 10 mukaisia yhdistelmäplasmideja. Mitä tahansa yhdistelmäplasmidia (paitsi pKY283:a tai pMY400:ää), joka koodaa funktionaalisia PmKR1-tolueenimono-oksyygenaasigeenejä, voidaan käyttää sopivan mikro-organismi-isäntäsolun transformoimiseksi kuten kuvattu esimerkissä 10. Edullisen menetelmän mukaan pMY402:ta käytetään yhdistelmäplasmidina, E. coli HB101:tä mikro-organismi-isäntäsoluna ja IPTG:tä indusorina kuten kuvattu esimerkissä 11. Saatu kanta nimettiin HB101/pMY402:ksi. Toisen edullisen menetelmän mukaan pKY287:ää käytetään yhdistelmäplasmidina, E. coli FM5:tä mikro-organismi-isäntäsoluna ja lämpöä (42°C, 1-3 tuntia) indusorina. Saatu kanta nimettiin FM5/pKY287:ksi.

Kutakin konversiota varten fenyyliyhdistettä (esimerkiksi kaavan I, III tai V mukaista) sekoitetaan HB101/pMY402- tai FM5/pKY287-soluihin. Seosta inkuboidaan riittävän pitkän ajan biokonversion aikaansaamiseksi, minkä jälkeen se analysoidaan kuten kuvattu osassa A fenoliyhdisteiden läsnäolon suhteen. Kutakin biokonversiota HB101/pMY402-soluilla silmälläpitäen soluja täytyy kasvat-  
 5 taa ja ne tulee analysoida IPTG:n läsnäollessa PmKR1-tolueenimono-oksygenaasiaktiivisuuden indusoimiseksi seuraavasti. Soluja kasvatetaan PAS-kasvualustassa, joka sisältää 0,4 % glutamaattia ja pitoisuuden 1 mM IPTG, tai niitä kasvatetaan L-liemessä, joka käsittää pitoisuuden 1 mM IPTG, kyllästyspisteeseen. Solut uudelleenlietetään sopivaan tilavuuteen samaa kasvualustaa optiseen tiheyteen 3,0  
 10 660 nm:n aallonpituudella ja inkuboidaan substraatilla, minkä jälkeen suoritetaan määrittäminen kuten kuvattu osassa A. Kutakin biokonversiota FM5/pKY287-soluilla silmälläpitäen soluja tulee kasvat-  
 15 taa seuraavissa lämpötila-olosuhteissa PmKR1-tolueenimono-oksygenaasiaktiivisuuden indusoimiseksi. FM5/pKY287-soluja kasvatetaan L-liemessä optiseen tiheyteen 0,4 660 nm:n aallonpituudella. Viljelmiä inkuboidaan ravistellen 42°C:ssa 3 tunnin ajan, minkä jälkeen ne siirretään 30°C:seen ja inkuboidaan edelleen 2 tunnin ajan. Solut uudelleenlietetään tuoreeseen L-liemeen opti-  
 20 seksi tiheydeksi 3,0 660 nm:n aallonpituudella, niitä inkuboidaan substraatilla ja suoritetaan määrittäminen kuten kuvattu osassa A.

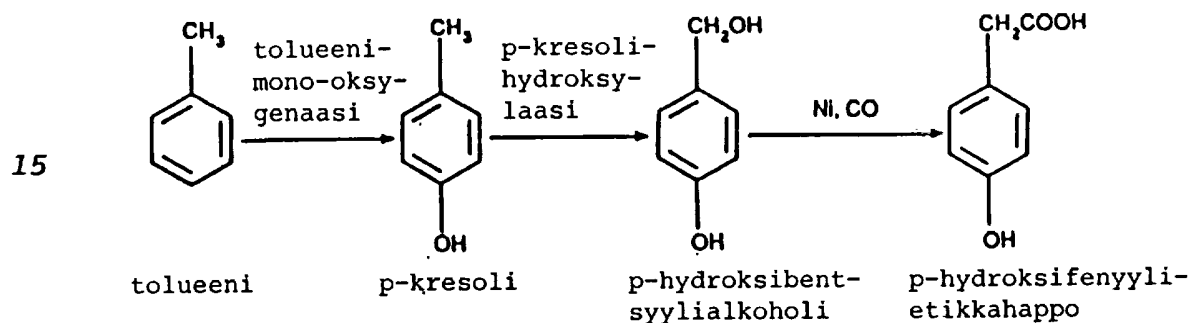
### Esimerkki 13

Tolueenin muuttaminen p-hydroksifenyylietikkahapoksi  
 30 si

#### A. Konversio PmKR1-soluilla

Tolueenisubstraatin muuttamiseksi p-hydroksifenyylietikkahapoksi tolueenia sekoitetaan PmKR1-mutanttiin, joka on puutteellinen p-hydroksibentsaldehydidehydrogenaasin osalta, kuten kuvattu esimerkissä 4, ja inkuboidaan  
 35

riittävän pitkän ajan tolueenin muuttamiseksi p-hydroksibentsyylialkoholiksi. Toisessa vaiheessa p-hydroksibentsyylialkoholiviluotteen sisältävä soluseos saatetaan reagoimaan nikkelin (Ni) ja hiilimonoksidin (CO) kanssa  
 5 sellaisina pitoisuuksina ja sellaisissa lämpötiloissa, jotka ovat riittävät p-hydroksibentsyylialkoholin muuttamiseksi p-hydroksifenyylietikkahapoksi, US-patenttijulkaisujen 4 482 497; 4 659 518; 4 631 348 menetelmien mukaan, jotka sisällytetään täten tähän viitteiksi. Konversiokaavio esitetään seuraavasti:



20                      B. Konversio mikro-organismi-isäntäsoluilla, jotka sisältävät PmKR1-tolueenimono-oksyygenaasigeenejä koodaavia yhdistelmäplasmideja

Sama osan A mukainen konversio voidaan suorittaa käyttämällä mikro-organismi-isäntäsoluja, jotka sisältävät  
 25 p-kresolihydroksylaasigeenin ja esimerkin 10 mukaisia yhdistelmäplasmideja. p-Kresolihydroksylaasigeeni voidaan kloonata tavanomaisilla geenimanipulointitekniikoilla lukuisista tämän geenin sisältävistä mikro-organismeista, mukaanlukien esimerkiksi PmKR1:stä tai plasmidista pND50 (Hewetson *et.al.*, *Genet.Res.Camb.* 32 (1978) 249-255). Mitä  
 30 tahansa yhdistelmäplasmidia (lukuunottamatta pKY283:a tai pMY400:ää), joka koodaa funktionaalisia PmKR1-tolueenimono-oksyygenaasigeenejä, voidaan käyttää sopivan, esimerkiksi 10 kuvatus mukaisen mikro-organismi-isäntäsolun  
 35 transformoimiseksi. Edullisen menetelmän mukaan käytetään

HB101/pMY402-soluja. Toisen edullisen menetelmän mukaan käytetään FM5/pKY287-soluja.

Osassa A esitettyä konversiota silmälläpitäen tolueenia sekoitetaan HB101/pMY402-soluihin, joita kasvatetaan suorittaen indusointi IPTG:llä, tai FM5/pKY287-soluihin, joita kasvatetaan suorittaen indusointi lämmöllä kuten kuvattu esimerkissä 12. Seosta inkuboidaan riittävän pitkän ajan tolueenin muuttamiseksi p-hydroksibentsyylialkoholiksi, minkä jälkeen se saatetaan reagoimaan Ni:n ja CO:n kanssa osan A mukaisesti konversion p-hydroksifenyylietikkahapoksi aikaansaamiseksi.

#### Esimerkki 14

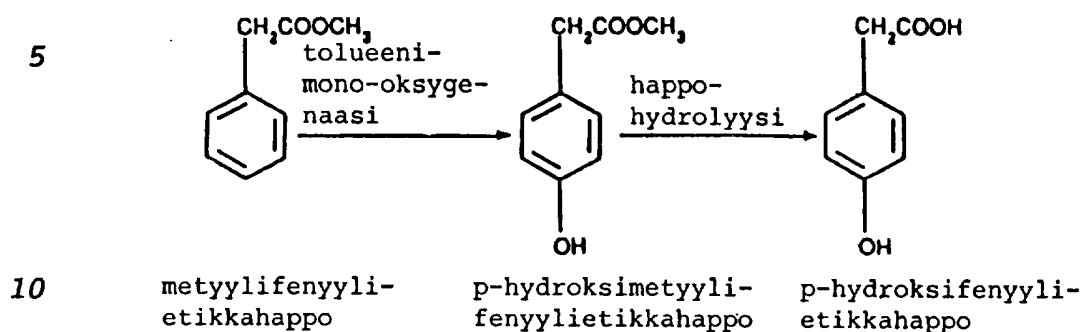
Metyylifenyylietikkahapon konversio p-hydroksifenyylietikkahapoksi

15 A. Konversio PmKR1-soluilla

Metyylifenyylietikkahapposubstraatin muuttamiseksi p-hydroksifenyylietikkahapoksi metyylietikkahappoa sekoitetaan esimerkissä 12 kuvatun mukaisesti kasvatettuun PmKR1:een ja inkuboidaan riittävän pitkän ajan metyylietikkahapon muuttamiseksi p-hydroksimetyylifenyylietikkahapoksi. Toisessa vaiheessa p-hydroksifenyylietikkahappo-väli tuotteen sisältävään soluseokseen kohdistetaan happohydrolyysi happopitoisuuksissa ja lämpötiloissa, jotka ovat riittävät p-hydroksimetyylifenyylietikkahapon muuttamiseksi p-hydroksifenyylietikkahapoksi. Konversio-kaavio esitetään seuraavasti:

30

35



15            B. Konversio mikro-organismi-isäntäsoluilla, jotka sisältävät PmKR1-tolueenimono-oksygenaasigeenejä koodaavia yhdistelmäplasmideja

20            Sama osan A mukainen konversio voidaan suorittaa käyttämällä mikro-organismi-isäntäsoluja, jotka sisältävät esimerkin 10 mukaisia yhdistelmäplasmideja. Mitä tahansa yhdistelmäplasmidia (lukuunottamatta pKY283:a tai pMY400:ää), joka koodaa funktionaalisia PmKR1-tolueeni-mono-oksygenaasigeenejä, voidaan käyttää sopivan, esimerkiksi 10 kuvatus mukaisen mikro-organismi-isäntäsolun transformoimiseksi. Edullisen menetelmän mukaan käytetään HB101/pMY402-soluja. Toisen edullisen menetelmän mukaan käytetään FM5/pKY287-soluja.

30            Konversion suorittamiseksi osassa A esitetyn mukaisesti metyylifenyylie-  
 etikkahappoa sekoitetaan HB101/pMY402-  
 soluihin, joita kasvatetaan suorittaen indusointi IPTG:llä, tai FM5/pKY287-soluihin, joita kasvatetaan suorittaen indusointi lämmöllä, kuten kuvattu esimerkissä 12. Seosta inkuboidaan riittävän pitkän ajan p-hydroksimetyylietikkahapon biokonversion aikaansaamiseksi, minkä jälkeen seokseen kohdistetaan happohydrolyysi happopitoisuuk-

35

sissa ja lämpötiloissa, jotka ovat riittävät p-hydroksifynyylietikkahapon saamiseksi.

Esimerkki 15

Indolin konversio indigoksi

5 A. Konversio PmKR1-soluilla

Indolisubstraatin muuttamiseksi indigoksi 50 mikrogrammaa/ml indolia sekoitettiin esimerkissä 12 kuvattun mukaisesti kasvatettuihin PmKR1-soluihin ja inkuboitiin riittävän pitkän ajan indolin muuttamiseksi indigoksi, yleensä 48 tuntia. Indigo voidaan eristää soluseoksesta Ensleyn US-patenttijulkaisun n:o 4,520,103 esimerkissä 10 5 kuvaaman menettelyn mukaan.

15 B. Konversio mikro-organismi-isäntäsoluilla, jotka sisältävät PmKR1-tolueenimono-oksyygenaasigeenejä koodaavia yhdistelmäplasmideja

Sama osan A mukainen konversio voidaan suorittaa käyttämällä mikro-organismi-isäntäsoluja, jotka sisältävät esimerkin 10 mukaisia yhdistelmäplasmideja. Mitä tahansa 20 yhdistelmäplasmidia (lukuunottamatta pKY283:a tai pMY400:ää), joka koodaa funktionaalisia PmKR1-tolueenimono-oksyygenaasigeenejä, voidaan käyttää sopivan, esimerkissä 10 kuvattun mukaisen mikro-organismi-isäntäsolun transformoimiseksi. Edullisen menetelmän mukaan käytetään HB101/pMY402-soluja. Toisen edullisen menetelmän mukaan 25 käytetään FM5/pKY287-soluja.

Osassa A esitetyn konversion suorittamiseksi indolia sekoitetaan HB101/pMY402-soluihin, joita kasvatetaan suorittaen indusointi IPTG:llä, tai FM5/pKY287-soluihin, joita kasvatetaan suorittaen indusointi lämmöllä, kuten 30 kuvattu esimerkissä 12. Seosta inkuboidaan riittävän pitkän ajan indolin biokonversion indigoksi saamiseksi. Indigo voidaan eristää soluseoksesta osan A mukaisella menettelyllä.

**Patenttivaatimukset**

1. Eristetty, biologisesti funktionaalinen plasmidi, joka on peräisin tolueenimono-oksygenaasigeenejä sisältävästä Pseudomonas mendocina KR-1:stä, t u n n e t t u siitä, että geeni sijaitsee DNA-fragmentilla, jolla on kuviossa 3 esitetty restriktiokartta, ja että eristetyllä, biologisesti funktionaalisella plasmidilla on sellaiset tunnisteominaisuudet, että se sisältää tolueenimono-oksygenaasigeenejä ja kykenee täten siirtämään kyvyn muuttaa tolueenia p-kresoliksi mikro-organismi-isäntäsolulle, jolta puuttuu tämä kyky.

2. Pseudomonas-suvun mikro-organismi-isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että siihen on siirretty konjugoimalla patenttivaatimuksen 1 mukainen biologisesti funktionaalinen plasmidi.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen mikro-organismi-isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että Pseudomonas on Pseudomonas putida Y2101.

4. Yhdistelmäplasmidi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää plasmidivektorin, johon on insertoitu DNA-segmentti, jolla on kuviossa 3 esitetty restriktiokartta ja joka koodaa Pseudomonas mendocina KR-1:stä eristettyjä tolueenimono-oksygenaasigeenejä.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen yhdistelmäplasmidi, joka yhdistelmäplasmidi on biologisesti funktionaalinen, t u n n e t t u siitä, että se kykenee transformoimaan mikro-organismi-isäntäsolun ja tuottamaan kyvyn muuttaa tolueenia p-kresoliksi mikro-organismi-isäntäsolulle, jolta puuttuu tämä kyky.

6. Patenttivaatimuksen 4 mukainen yhdistelmäplasmidi, t u n n e t t u siitä, että plasmidivektori on pUC18, pUC19, pKY235, joka on talletettu E. coli -kantaan ATCC 67671, pMMB66EH, pMB66HE tai pCFM1146, joka on talletettu E. coli -kantaan ATCC 67672.

7. Patenttivaatimuksen 4 mukainen yhdistelmäplasmidi, t u n n e t t u siitä, että DNA-segmentti on 20,5 kb:n SacI-fragmentti, jonka restriktiokartta on kuviossa 3 esitetyn mukainen, tai sen aktiivinen alafragmentti.

5 8. Patenttivaatimuksen 4 mukainen yhdistelmäplasmidi, t u n n e t t u siitä, että DNA-segmentti on 10,2 kb:n SacI-fragmentti, jonka restriktiokartta on kuviossa 3 esitetyn mukainen.

10 9. Patenttivaatimuksen 4 mukainen yhdistelmäplasmidi, t u n n e t t u siitä, että DNA-segmentti on 7,7 kb:n SacI-BamHI-fragmentti, jonka restriktiokartta on kuviossa 3 esitetyn mukainen.

15 10. Patenttivaatimuksen 4 mukainen yhdistelmäplasmidi, t u n n e t t u siitä, että DNA-segmentti on 6,2 kb:n SacI-SphI-fragmentti, jonka restriktiokartta on kuviossa 3 esitetyn mukainen.

20 11. Patenttivaatimuksen 4 mukainen yhdistelmäplasmidi, t u n n e t t u siitä, että DNA-segmentti on 5,9 kb:n SacI-XmaI-fragmentti, jonka restriktiokartta on kuviossa 3 esitetyn mukainen.

25 12. Patenttivaatimuksen 4 mukainen yhdistelmäplasmidi, t u n n e t t u siitä, että DNA-segmentti on 4,6 kb:n XhoI-fragmentti, jonka restriktiokartta on kuviossa 3 esitetyn mukainen.

30 13. Patenttivaatimuksen 4 mukainen yhdistelmäplasmidivektori, t u n n e t t u siitä, että se käsittää pKY235:n, joka on talletettu E. coli -kantaan ATCC 67671, tai pCFM1146:n, joka on talletettu E. coli -kantaan ATCC 67672.

35 14. Mikro-organismi-isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se on transformoitu patenttivaatimuksen 4 mukaisella yhdistelmäplasmidilla.

15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen mikro-organismi-isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että mikro-organismi-isäntäsolu on E. coli JM109, JM83, HB101 tai FM5.

16. Patenttivaatimuksen 14 mukainen mikro-organis-  
mi-isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se on trans-  
formoitu patenttivaatimuksen 7 mukaisella yhdistelmäplas-  
midilla.

5 17. Patenttivaatimuksen 14 mukainen mikro-organis-  
mi-isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se on trans-  
formoitu patenttivaatimuksen 8 mukaisella yhdistelmäplas-  
midilla.

10 18. Patenttivaatimuksen 14 mukainen mikro-organis-  
mi-isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se on trans-  
formoitu patenttivaatimuksen 9 mukaisella yhdistelmäplas-  
midilla.

15 19. Patenttivaatimuksen 14 mukainen mikro-organis-  
mi-isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se on trans-  
formoitu patenttivaatimuksen 10 mukaisella yhdistelmäplas-  
midilla.

20 20. Patenttivaatimuksen 14 mukainen mikro-organis-  
mi-isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se on trans-  
formoitu patenttivaatimuksen 11 mukaisella yhdistelmäplas-  
midilla.

25 21. Patenttivaatimuksen 14 mukainen mikro-organis-  
mi-isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se on trans-  
formoitu patenttivaatimuksen 12 mukaisella yhdistelmäplas-  
midilla.

30 22. DNA-segmentti, t u n n e t t u siitä, että se  
käsittää 20,5 kb:n SacI-fragmentin, jonka restriktiokartta  
on kuviossa 3 esitetyn mukainen, tai sen alafragmentin,  
joka DNA-segmentti koodaa Pseudomonas mendocina KR-1:stä  
eristettyjä tolueenimono-oksygenaasi-geenejä.

35 23. Menetelmä fenyyliyhdisteen mikrobialisen bio-  
konversion fenolihyhdisteeksi suorittamiseksi hydroksyloi-  
malla, t u n n e t t u siitä, että fenyyliyhdiste saate-  
taan reagoimaan Pseudomonas mendocina KR-1 -solujen kans-  
sa, tai patenttivaatimuksen 14 mukaisten mikro-organis-  
mi-isäntäsolujen kanssa, jolloin soluja on käsitelty toluee-  
nimono-oksygenaasigeenejä indusoivalla aineella.

24. Patenttivaatimuksen 23 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että fenyyliyhdiste käsittää tolueenia, metyylifenyylitikkahappoa, etyylifenyylitikkahappoa, 2-fenyylietanolia, asetanilidia, fluoribentseeniä tai etyylibentseeniä.

5  
25. Mikrobiaalisentsymaattinen menetelmä p-hydroksifenyylitikkahapon valmistamiseksi tolueenista, t u n n e t t u siitä, että (a) tolueeni saatetaan reagoimaan Pseudomonas mendocina KR-1 -mutanttikannan kanssa, joka sisältää puutteellisen p-hydroksibentsaldehydidehydroge-  
10 naasin, tai patenttivaatimuksen 14 mukaisten mikro-organismi-isäntäsolujen kanssa, ja (b) käsitellään Ni:llä ja hiilimonoksidilla riittävän pitkän ajan, jotta tolueeni on oleellisesti muuttunut p-hydroksifenyylitikkahapoksi.

15  
26. Mikrobiaalisentsymaattinen menetelmä p-hydroksifenyylitikkahapon valmistamiseksi metyylifenyylitikkahaposta, t u n n e t t u siitä, että (a) metyylifenyylitikkahappo saatetaan reagoimaan Pseudomonas mendocina KR-1 -solujen kanssa, tai patenttivaatimuksen 14 mukaisten  
20 mikro-organismi-isäntäsolujen kanssa, jolloin soluja on käsitelty tolueenimono-oksygenaasigeenejä indusoivalla aineella, ja (b) hydrolysoidaan hapolla riittävän pitkän ajan, jotta metyylifenyylitikkahappo on oleellisesti muuttunut p-hydroksifenyylitikkahapoksi.

25  
27. Mikrobiaalisentsymaattinen menetelmä indigon valmistamiseksi indolista, t u n n e t t u siitä, että indoli saatetaan reagoimaan Pseudomonas mendocina KR-1 -solujen kanssa, tai patenttivaatimuksen 14 mukaisten mikro-organismi-isäntäsolujen kanssa, jolloin soluja on käsi-  
30 telty tolueenimono-oksygenaasigeenejä indusoivalla aineella.

**Patentkrav**

1. Isolerad biologiskt funktionell plasmid från Pseudomonas mendocina KR-1 som innehåller toluenmonooxygenasgener, k ä n n e t e c k n a d därav, att genen är belägen på et DNA-fragment som har den i figur 3 angivna restriktionskartan och att den isolerade, biologiskt funktionella plasmiden den har sådana identifikationsegenskaper som består i att den innehåller toluenmonooxygenasgener och att den därigenom förmår överföra förmågan att omvandla toluen till p-kresol till en mikroorganismvärdcell som saknar denna förmåga.

2. Mikroorganismvärdcell av släktet Pseudomonas, k ä n n e t e c k n a d därav, att den biologiskt funktionella plasmiden enligt patentkrav 1 överförts i denna genom konjugering.

3. Mikroorganismvärdcell enligt patentkrav 2, k ä n n e t e c k n a d därav, att Pseudomonas är Pseudomonas putida Y2101.

4. Rekombinant plasmid, k ä n n e t e c k n a d därav, att den omfattar en plasmidvektor, i vilken ett DNA-segment införts vilket har den i figur 3 angivna restriktionskartan, och vilket kodar för toluenmonooxygenasgener, vilka isolerats från Pseudomonas mendocina KR-1.

5. Rekombinant plasmid enligt patentkrav 4, vilken rekombinant plasmid är biologiskt funktionell, k ä n n e t e c k n a d därav att den har identifikationsegenskaper som består i att den förmår transformera och förläna förmågan av omvandla toluen till p-kresol åt en mikroorganismvärdcell som saknar denna förmåga.

6. Rekombinant plasmid enligt patentkrav 4, k ä n n e t e c k n a d därav, att plasmidvektorn är pUC18, pUC19, pKY235, som deponerats i E.coli-stammen ATCC 67671, pMMB66EH, pMB66HE eller pCFM1146, som deponerats i E.coli-stammen ATCC 67672.

7. Rekombinant plasmid enligt patentkrav 4, k ä n -  
n e t e c k n a d därav, att DNA-segmentet är ett 20.5 kb  
Sac I-fragment med restriktionskartan enligt figur 3 eller  
ett aktivt underfragment därav.

5 8. Rekombinant plasmid enligt patentkrav 4, k ä n -  
n e t e c k n a d därav, att DNA-segmentet är ett 10.2 kb  
Sac I-fragment med restriktionskartan enligt  
figur 3.

10 9. Rekombinant plasmid enligt patentkrav 4, k ä n -  
n e t e c k n a d därav, att DNA-segmentet är ett 7.7 kb  
Sac I-BamHI-fragment med restriktionskartan enligt figur  
3.

15 10. Rekombinant plasmid enligt patentkrav 4, k ä n -  
n e t e c k n a d därav, att DNA-segmentet är ett 6.2 kb  
Sac I-SphI-fragment med restriktionskartan enligt figur 3.

11. Rekombinant plasmid enligt patentkrav 4, k ä n -  
n e t e c k n a d därav, att DNA-segmentet är ett 5.9 kb  
Sac I-XmaI-fragment med restriktionskartan enligt figur 3.

20 12. Rekombinant plasmid enligt patentkrav 4, k ä n -  
n e t e c k n a d därav, att DNA-segmentet är ett 4.6 kb  
XhoI-fragment med restriktionskartan enligt  
figur 3.

25 13. Plasmidvektor, enligt patentkrav 4, k ä n n e -  
t e c k n a d därav, att den omfattar pKY235, som de-  
ponerats i E.coli-stammen ATCC 67671 eller pCFM1146, som  
deponerats i E.coli-stammen ATCC 67672.

30 14. Mikroorganismvärdcell, k ä n n e t e c k n a d  
därav, att den transformerats med den rekombinanta plasmid-  
den enligt patentkrav 4.

15. Mikroorganismvärdcell enligt patentkrav 14,  
k ä n n e t e c k n a d därav, att mikroorganismvärdcel-  
len är E.coli JM109, JM83, HB101 eller FM5.

35 16. Mikroorganismvärdcell enligt patentkrav 14,  
k ä n n e t e c k n a d därav, att den transformerats med  
den rekombinanta plasmiden enligt patentkravet 7.

17. Mikroorganismvärdcell enligt patentkrav 14, k ä n n e t e c k n a d därav, att den transformerats med den rekombinanta plasmiden enligt patentkrav 8.

5 18. Mikroorganismvärdcell enligt patentkrav 14, k ä n n e t e c k n a d därav, att den transformerats med den rekombinanta plasmiden enligt patentkrav 9.

19. Mikroorganismvärdcell enligt patentkrav 14, k ä n n e t e c k n a d därav, att den transformerats med den rekombinanta plasmiden enligt patentkrav 10.

10 20. Mikroorganismvärdcell enligt patentkrav 14, k ä n n e t e c k n a d därav, att den transformerats med den rekombinanta plasmiden enligt patentkrav 11.

15 21. Mikroorganismvärdcell enligt patentkrav 14, k ä n n e t e c k n a d därav, att den transformerats med den rekombinanta plasmiden enligt patentkrav 12.

22. DNA-segment, k ä n n e t e c k n a t därav, att det omfattar 20.5 kb SacI-fragmentet med restriktionskartan enligt figur 3 eller ett underfragment därav, varvid DNA-segmentet kodar för toluenmonooxygenasgener som isolerats från *Pseudomonas mendocina* KR-1.

25 23. Förfarande för mikrobiell bioomvandling av en fenylförening till en fenolförening genom hydroxylering, k ä n n e t e c k n a t därav, att fenylföreningen reageras med *Pseudomonas mendocina* KR-1-celler eller med mikroorganismvärdcellerna enligt patentkrav 14, varvid cellerna behandlats med ett toluenmonooxygenasgener inducerande medel.

30 24. Förfarande enligt patentkrav 23, k ä n n e t e c k n a t därav, att fenylföreningen omfattar toluen, metylfenylättiksyra, etylfenylättiksyra, 2-fenyletanol, acetanilid, fluorbensen eller etylbensen.

25. Mikrobiellt enzymatiskt förfarande för framställning av p-hydroxifenylättiksyra av toluen, k ä n n e t e c k n a t därav, att man

(a) bringar toluen att reagera med en mutant stam av Pseudomonas mendocina KR-1, vilken innehåller defekt p-hydroxibensaldehydehydrogenas eller med mikroorganismvärdceller enligt patentkrav 14, och

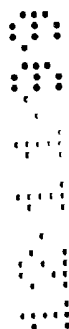
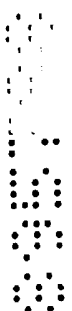
5 (b) behandlar med Ni och kolmonoxid under tillräckligt lång tid tills toluenet väsentligen omvandlats till p-hydroxifenylättiksyra

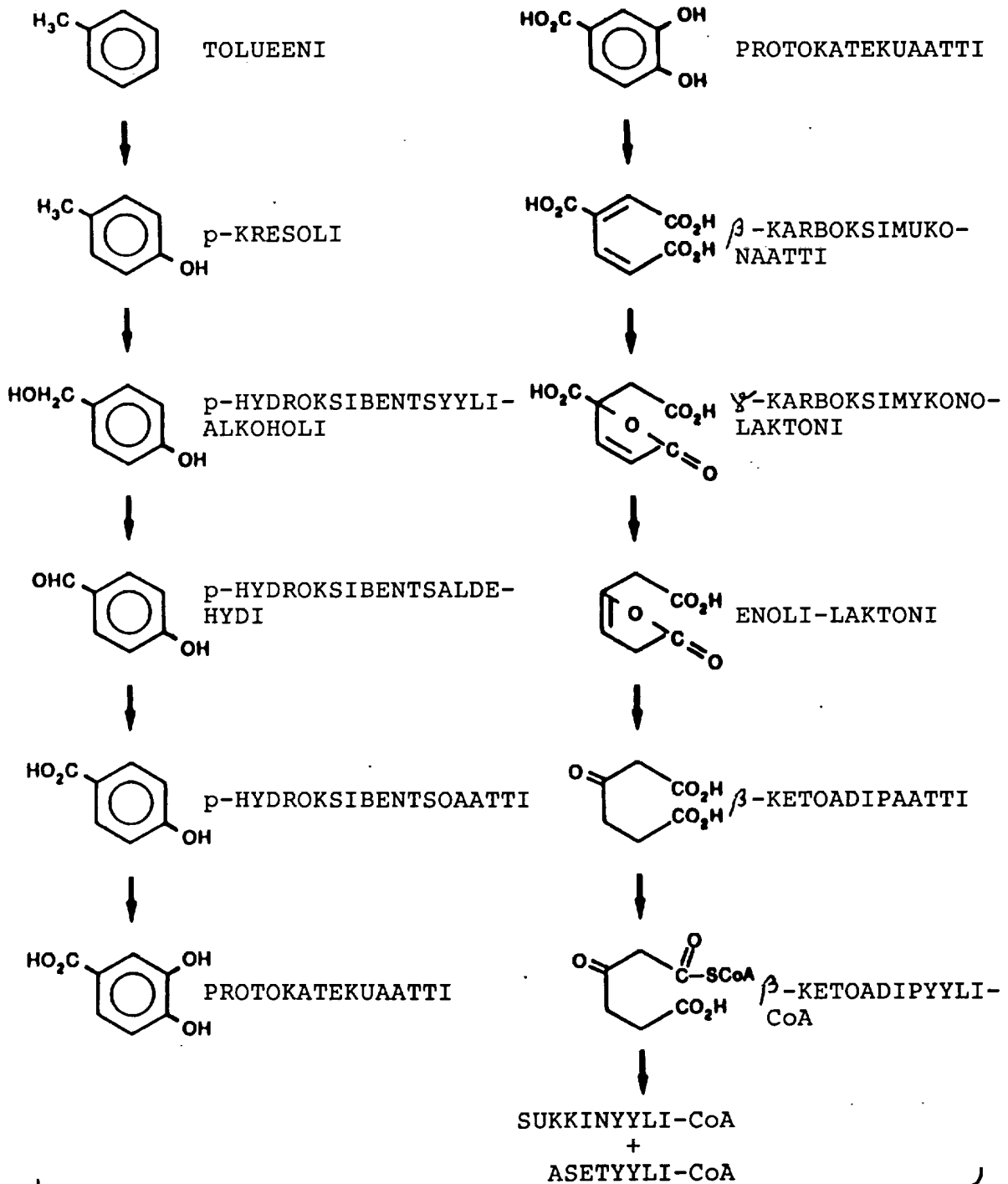
26. Mikrobiellt, enzymatiskt förfarande för framställning av p-hydroxifenylättiksyra av metylfenylättiksyra, k å n n e t e c k n a t därav, att man

10 (a) bringar metylfenylättiksyra att reagera med Pseudomonas mendocina KR-1-celler, eller med mikroorganismvärdceller enligt patentkrav 14, varvid cellerna behandlats med ett toluenmonooxygenasgener inducerande medel och

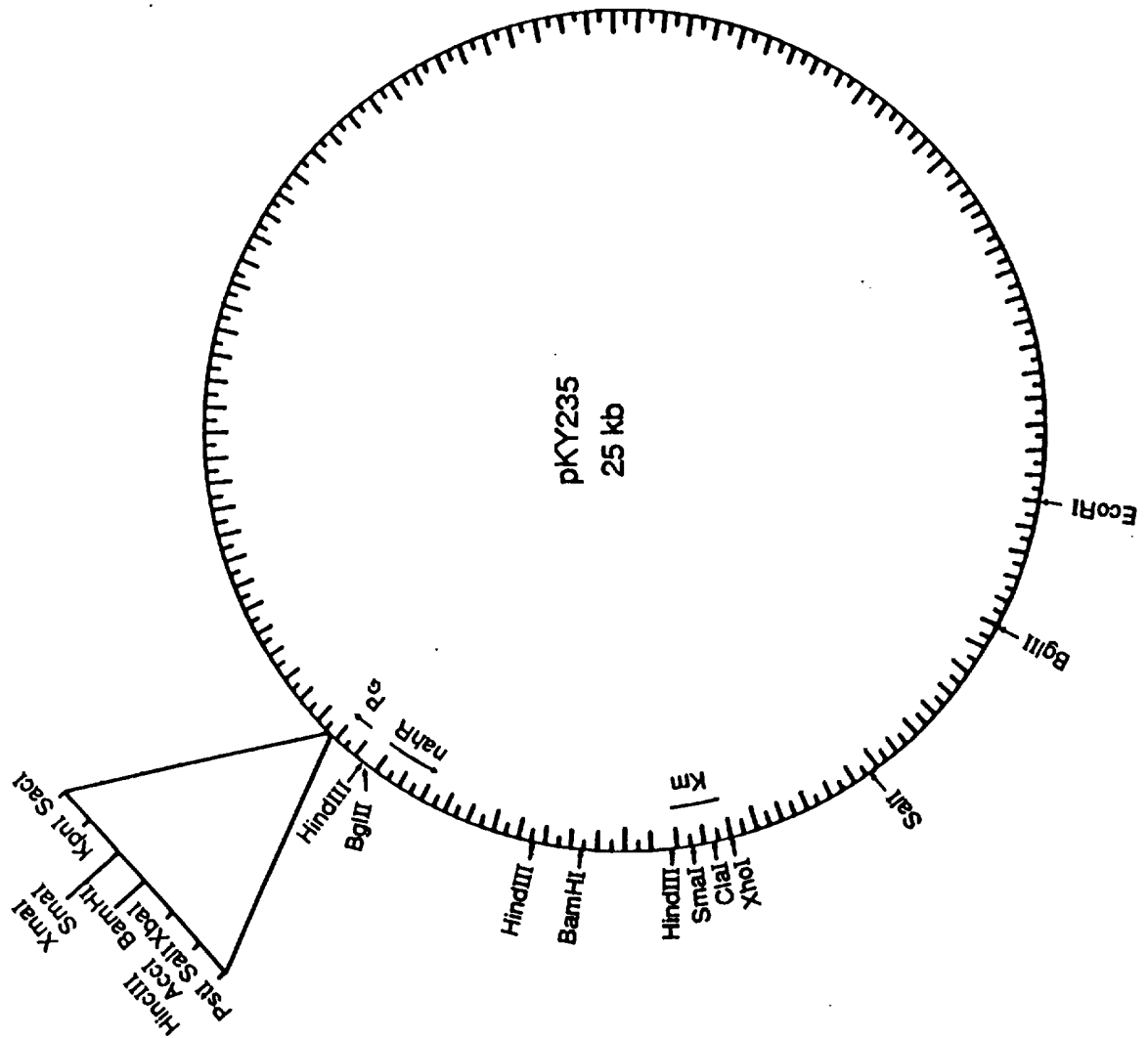
15 (b) hydrolyserar med syra under tillräckligt lång tid tills metylfenylättiksyran väsentligen omvandlats till p-hydroxifenylättiksyra.

27. Mikrobiellt, enzymatiskt förfarande för framställning av indigo av indol, k å n n e t e c k n a t därav, att man bringar indol att reagera med Pseudomonas mendocina KR-1-celler eller med mikroorganismvärdceller enligt patentkrav 14, varvid cellerna behandlats med ett toluenmonooxygenasgener inducerande medel.



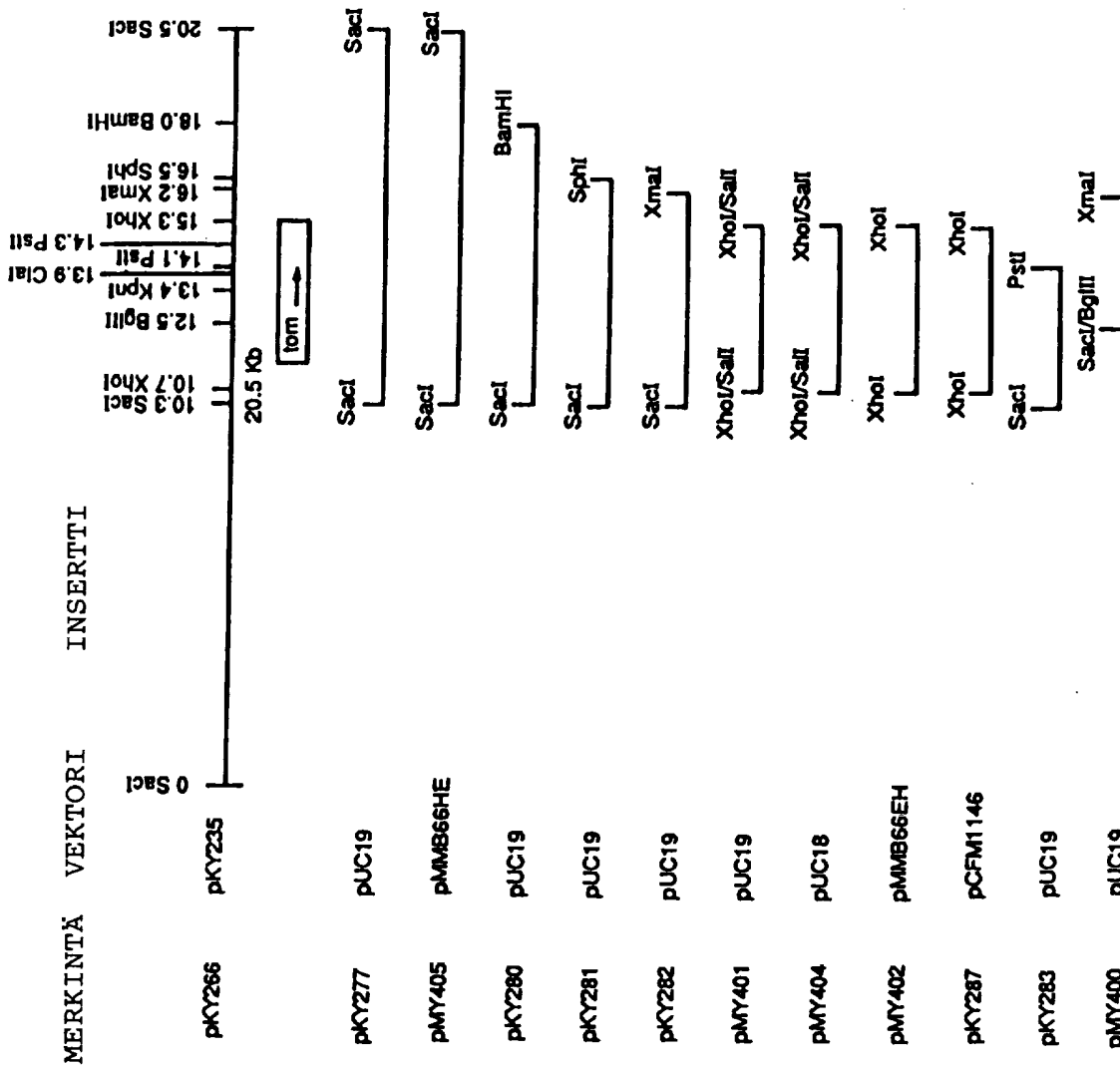


KUVIO 1



KUVIO 2

101198 101198



KUVIO 3