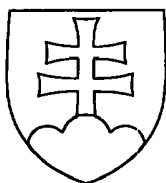


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ
PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU**

- (22) Dátum podania prihlášky: **1. 12. 2000**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **199 59 329.9**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **9. 12. 1999**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **DE**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **11. 9. 2001**
Vestník ÚPV SR č. **09/2001**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT:
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT:

(11), (21) Číslo dokumentu:

1833-2000

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷

**C12P 13/04,
C12P 13/08,
C12N 1/21
//(C12N 1/21,
C12R 1:15)**

(71) Prihlasovateľ: **Degussa-Hüls Aktiengesellschaft, Frankfurt am Main, DE;
Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich, DE;**

(72) Pôvodca: **Ziegler Petra, Aachen, DE;
Eggeling Lothar, Dr., Jülich, DE;
Sahm Hermann, prof., Jülich, DE;
Thierbach Georg, Dr., Bielefeld, DE;
Pfefferle Walter, Dr., Halle, DE;**

(74) Zástupca: **Bušová Eva, JUDr., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Spôsob fermentačnej výroby L-aminokyselín použitím koryneformných baktérií**

(57) Anotácia:
Spôsob výroby L-aminokyselín je založený na nasledovných krokoch: a) fermentácia baktérií produkujúcich žiadajú L-aminokyselinu, v ktorých sa zoslabuje aspoň gén glyA, najmä odstránením prirodzeného promotora, b) koncentrovanie žiadanej produktu v médiu alebo v bunkách baktérií a c) izolácia L-aminokyseliny, pričom sa používajú baktérie, v ktorých sa výhodne zosilňujú ďalšie gény biosyntetickej dráhy žiadanej L-aminokyseliny, alebo sa používajú baktérie, v ktorých sa aspoň čiastočne eliminujú metabolické dráhy, ktoré znižujú tvorbu žiadanej L-aminokyseliny. Ďalej sú uvedené nukleotidové sekvencie lacI-tac-5' glyA, prípadne lacI-tac-glyA-zvyšku.

Spôsob fermentačnej výroby L-aminokyselín použitím koryneformných baktérií

Oblasť techniky

Predmetom vynálezu je spôsob fermentačnej výroby L-aminokyselín, najmä L-treonínu, použitím koryneformných baktérií, v ktorých sa zoslabuje gén glyA.

Doterajší stav techniky

L-Aminokyseliny sa používajú vo výžive zvierat, v humannej medicíne a vo farmaceutickom priemysle.

Je známe, že aminokyseliny sa vyrábajú fermentáciou kmeňov koryneformných baktérií, najmä *Corynebacterium glutamicum*. Kvôli veľkému významu sa stále pracuje na zlepšení spôsobov výroby. Zlepšenia spôsobov sa môžu týkať fermentačno-technologických opatrení, ako napríklad miešania a zásobovania kyslíkom alebo zloženia živných médií, ako napríklad koncentrácie cukru počas fermentácie, alebo spracovania na produktovú formu, napríklad ionexovou chromatografiou, alebo vlastných úžitkových vlastností samotného mikroorganizmu.

Na zlepšenie úžitkových vlastností týchto mikroorganizmov sa používajú metódy mutagenézy, selekcie a voľby mutantov. Týmto spôsobom sa získajú kmene, ktoré sú rezistentné voči antimetabolitom, ako je napríklad analóg treonínu kyselina α -amino- β -hydroxyvalérová (AHV), alebo sú auxotrofné

vzhľadom na regulačne významné metabolity a produkujú L-aminokyseliny, napríklad treonín.

Už niekoľko rokov sa taktiež používajú metódy technológie rekombinantných DNA na kmeňové zlepšenie kmeňov *Corynebacterium* produkujúcich L-aminokyselinu tak, že jednotlivé gény pre biosyntézu aminokyseliny sa amplifikujú a skúma sa účinok na produkciu L-aminokyseliny. Prehľadný článok k tomu sa nachádza medzi iným v Kinoshita („Glutamic Acid Bacteria“, in: *Biology of Industrial Microorganisms*, Demain and Solomon (eds.), Benjamin Cummings, Londýn, Veľká Británia, 1985, 115-142), Hilliger (*BioTec* 2, 40-44 (1991)), Eggeling (*Amino Acids* 6, 261-272 (1994)), Jetten a Sinskey (*Critical Reviews in Biotechnology* 15, 73-103 (1995)) a Sahm et al. (*Annals of the New York Academy of Science* 782, 25-39 (1996)).

Vynálezcovia si stanovili za úlohu poskytnúť nové základy zlepšených spôsobov fermentačnej výroby L-aminokyselín pomocou koryneformných baktérií.

L-Aminokyseliny sa používajú v humánnej medicíne, vo farmaceutickom priemysle, v potravinárskom priemysle a celkom obzvlášť vo výžive zvierat. Existuje preto všeobecný záujem o poskytnutie nových, zlepšených spôsobov výroby aminokyselín.

Keď sa v nasledovnom texte uvedie L-aminokyselina, mieni sa tým L-treonín alebo L-izoleucín.

Podstata vynálezu

Predmetom tohto vynálezu je spôsob fermentačnej výroby

L-aminokyselín použitím koryneformných baktérií, v ktorých sa zoslabuje, najmä na nízkej úrovni exprimuje aspoň nukleotidová sekvencia (gén glyA) kódujúca génový produkt glyA, žiadaný produkt sa koncentruje v médiu alebo v bunkách a izoluje sa L-aminokyselina.

Použitie kmene prednostne produkujú L-aminokyseliny už pred zoslabením génu glyA.

Prednostné formy uskutočnenia sa nachádzajú v nárokoch.

Pojem „zoslabenie“ opisuje v tejto súvislosti zníženie alebo elimináciu intracelulárnej aktivity jedného alebo viacerých enzýmov (proteínov) v mikroorganizme, ktoré sú kódované príslušnou DNA (tu génom glyA), tým, že sa napríklad použije slabý promótor alebo gén, poprípade alela, ktorá kóduje príslušný enzým s nízkou aktivitou, poprípade sa inaktivuje príslušný gén alebo enzým (proteín) a tieto opatrenia sa poprípade kombinujú.

Mikroorganizmy, ktoré sú predmetom predloženého vynálezu, môžu produkovať aminokyseliny z glukózy, sacharózy, laktózy, fruktózy, maltózy, melasy, škrobu, celulózy alebo z glycerolu a etanolu. Môže sa jednať o zástupcov koryneformných baktérií, najmä rodu *Corynebacterium*. Pri rode *Corynebacterium* treba uviesť najmä druh *Corynebacterium glutamicum*, ktorý je v odbornom svete známy pre svoju schopnosť produkovať L-aminokyseliny.

Vhodnými kmeňmi rodu *Corynebacterium*, najmä druhu *Corynebacterium glutamicum*, sú najmä známe kmene divého typu

Corynebacterium glutamicum ATCC13032,

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806,
Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870,
Corynebacterium melassecola ATCC17965,
Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539,
Brevibacterium flavum ATCC14067,
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 a
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

a z nich vytvorené mutanty, poprípade kmene, produkujúce
L-aminokyseliny, ako napríklad kmene produkujúce L-treonín

Corynebacterium glutamicum ATCC21649,
Brevibacterium flavum BB69,
Brevibacterium flavum DSM5399,
Brevibacterium lactofermentum FERM-BP 269,
Brevibacterium lactofermentum TBB-10 a

ako napríklad kmene produkujúce L-izoleucín

Corynebacterium glutamicum ATCC 14309,
Corynebacterium glutamicum ATCC 14310,
Corynebacterium glutamicum ATCC 14311,
Corynebacterium glutamicum ATCC 15168,
Corynebacterium ammoniagenes ATCC 6871.

Zistilo sa, že koryneformné baktérie po zoslabení génu
glyA zlepšeným produkujú spôsobom L-aminokyseliny.

Gén glyA kóduje enzým serínhydroxymetyltransferázu
(EC 2.1.2.1). Nukleotidová sekvencia génu glyA sa opísala v
japonskom zverejnenom spise JP-A-08107788. Gén glyA opísaný
v uvedenom texte sa môže použiť podľa vynálezu. Ďalej sa
môžu použiť alely génu glyA, ktoré vyplývajú z degenero-

vatelnosti genetického kódu alebo vznikajú funkčne neutrálnymi mutáciami so zmyslom (sense mutations).

Na dosiahnutie zoslabenia sa môže znížiť alebo vylúčiť buď expresia génu glyA, alebo katalytické vlastnosti génového produktu. Popríklad sa obidve tieto opatrenia kombinujú.

Expresia génov sa môže znížiť vhodným uskutočnením kultivácie alebo genetickou zmenou (mutáciou) signálnych štruktúr expresie génov. Signálnymi štruktúrami expresie génov sú napríklad represorové gény, aktivátorové gény, operátory, promótor, atenuátory, väzbové miesta pre ribozómy, iniciačný kodón a terminátory. Údaje k tomu nájdete odborník napríklad v patentovej prihláške WO 96/15246, v Boyd a Murphy (Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), vo Voskuil a Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), v Jensen a Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191 (1998)), v Pátek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)) a v známych učebniciach genetiky a molekulovej biológie, ako napríklad v učebnici od Knippers („Molekulare Genetik“, 6. vydanie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Nemecko, 1995) alebo Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Nemecko, 1990).

Mutácie, ktoré vedú k zmene, popríklad zoslabeniu katalytických vlastností enzýmových proteínov, sú známe zo stavu techniky; ako príklady sa môžu uviesť práce Qiu a Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762 (1997)) a Möckel („Die Threonin-dehydratase aus Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms“, správa

Výskumného centra Jülich, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Nemecko, 1994). Súborné opisy sa môžu prevziať zo známych učebníc genetiky a molekulovej biológie, ako napríklad Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986).

Ako mutácie prichádzajú do úvahy tranzície, transverzie, inzercie a delécie. V závislosti od účinku zámeny aminokyselín na enzýmovú aktivitu sa hovorí o mutáciách s pozmeneným zmyslom („missense mutations“) alebo mutáciách bez zmyslu („nonsense mutations“). Inzercie alebo delécie aspoň jedného páru báz v géne vedú k posunovým mutáciám („frame shift mutations“), následkom ktorých sa vkladajú nesprávne aminokyseliny alebo sa predčasne prerušuje translácia. Delécie viacerých kodónov vedú typicky k úplnému zlyhaniu enzýmovej aktivity. Návod na vytvorenie takých mutácií patria do stavu techniky a môžu sa nájsť v známych učebniciach genetiky a molekulovej biológie, ako napríklad v učebnici Knippers („Molekulare Genetik“, 6. vydanie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Nemecko, 1995), Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Nemecko, 1990) alebo Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986).

Gén glyA sa napríklad zoslabil odstránením prirodzeného promótoru a priradením regulovateľného kontrolného elementu uloženého v protismere. Ako kontrolný element sa použil systém lacI-tac. Aby sa mohlo dosiahnuť vsunutie systému lacI-tac proti smeru chromozómového génu glyA, pripravil sa integračný plazmid pK18mobglyA' (obrázok 1). Plazmid pK18mobglyA' obsahuje promótor tac (Amann et al., Gene 25: 167-178 (1983); De Boer et al., Proceedings of the National

Academy of Sciences of the United States of America USA 80: 21-25 (1983)) a priamo v smere promótoru tac obsahuje 5'-terminálnu sekvenciu génu glyA znázornenú v SEQ ID No 1. Plazmid obsahuje ďalej gén lacI kódujúci inhibítor Lac (Farabaugh, Nature 274: 765-769 (1978); Stark et al., Gene 51: 255-267 (1987)). Sekvencia jednotky lacI-tac-5'glyA je znázornená v SEQ ID No 2. Plazmid pK18mobglyA' je replikovatelný v *Escherichia coli*, nie však v *Corynebacterium glutamicum*. Po transformácii a homolognej rekombinácii pomocou „cross over“ udalosti spôsobujúcej integráciu sa získa intaktná kópia génu glyA, ktorého expresia sa môže kontrolovať, poprípade regulovať protismerne uloženým kontrolným elementom lacI-tac, a inaktívna kópia génu glyA skrátená (truncated) na 3'-konci, vrátane prirodzeného promótoru. Sekvencia jednotky lacI-tac-glyA je znázornená v SEQ ID No 3. SEQ ID No 4 znázorňuje známu aminokyselinovú sekvenciu génového produktu glyA. Pridaním vhodných koncentrácií analógu laktózy izopropyltiogalaktozidu (Fürste et al., Gene 48: 119-131 (1986)) sa môže expresia génu glyA kontrolovať, poprípade sa môže znížiť, poprípade nastaviť celulárny obsah serínhydroxymetyltransferázy.

Ďalšie návody a vysvetlenia k integračnej mutagenéze sa nachádzajú napríklad v Schwarzer a Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915-927 (1998)) alebo Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994)).

Príkladom kmeňa koryneformných baktérií produkujúceho aminokyselinu so zoslabeným génom glyA je producent treonínu *Corynebacterium glutamicum* DM368-2::pK18mobglyA'.

Prídavne môže byť pre produkciu aminokyselín výhodné prídavne k zoslabeniu génu glyA zosilniť jeden alebo viac enzýmov danej biosyntetickej dráhy, glykolýzy, anaplerotiky, cyklu kyseliny citrónovej alebo exportu aminokyseliny.

Takto sa na výrobu L-treonínu napríklad môže zvýšene exprimovať:

- súčasne gén hom kódujúci homoseríndehydrogenázu (Peoples et al., Molecular Microbiology 2, 63-72 (1988)) alebo alela hom^{dr} kódujúca „feed back rezistentnú“ homoseríndehydrogenázu (Archer et al., Gene 107, 53-59 (1991)) a/alebo
- súčasne gén gap kódujúci glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázu (Eikmanns et al., Journal of Bacteriology 174: 6076-6086 (1992)) alebo
- súčasne gén pyc kódujúci pyruvátkarboxylázu (Peters-Wendisch et al., Microbiology 144, 915-927 (1998)) alebo
- súčasne gén mqo kódujúci malát-chinónoxidoreduktázu (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395 - 403 (1998)) alebo
- súčasne gén thrE kódujúci export treonínu (DE 199 41 478.5; DSM 12840).

Ďalej môže byť pre produkciu aminokyselín výhodné okrem génu glyA súčasne zoslabiť

- gén pck kódujúci fosfoenolpyruvátkarboxykinázu (DE

199 50 409.1, DSM 13047) a/alebo

- gén *poxB* kódujúci pyruvát oxidázu (DE 199 51 975.7; DSM 13114).

Napokon môže byť pre produkciu aminokyselín výhodné okrem zoslabenia génu *glyA* vylúčiť nežiaduce vedľajšie reakcie (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms“, in: *Overproduction of Microbial Products*, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, Londýn, Veľká Británia, 1982).

Použité kultivačné médium musí vhodným spôsobom vyhovovať nárokom daných kmeňov. Opisy kultivačných médií rozličných mikroorganizmov sa nachádzajú v príručke „Manual of Methods for General Bacteriology“ od American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981). Ako zdroje uhlíka sa môžu používať cukry a sacharidy, ako je napríklad glukóza, sacharóza, laktóza, fruktóza, maltóza, melasa, škrob a celulóza; oleje a tuky, ako napríklad sójový olej, slnečnicový olej, podzemnicový olej a kokosový olej; mastné kyseliny, ako je kyselina palmitová, kyselina stearová, kyselina linolová; alkoholy, ako je napríklad glycerol a etanol; a organické kyseliny, ako je napríklad kyselina octová. Tieto látky sa môžu používať ako jednotlivé zložky alebo ako zmes. Ako zdroje dusíka sa môžu používať organické zlúčeniny obsahujúce dusík, napríklad peptóny, kvasnicový extrakt, mäsový extrakt, sladový extrakt, kukuričný extrakt, sójová múka a močovina, alebo anorganické zlúčeniny, ako je napríklad síran amónny, chlorid amónny, fosforečnan amónny, uhličitan amónny a dusičnan amónny. Zdroje dusíka sa môžu používať jednotlivo alebo ako zmes. Ako zdroje fosforu sa môžu používať kyselina fosforečná, dihydrogenfosforečnan draselný alebo hydrogenfosforečnan draselný alebo príslušné sodné

solí. Kultivačné médium musí ďalej obsahovať soli kovov, ako napríklad síran horečnatý alebo síran železa, ktoré sú potrebné na rast. Napokon sa môžu prídavne k vyššie uvedeným látkam používať esenciálne rastové látky, ako sú aminokyseliny a vitamíny. Ku kultivačnému médiu sa môžu okrem toho pridávať vhodné prekurzory. Uvedené vsádzkové suroviny sa môžu ku kultúre pridávať vo forme jednorazovej vsádzky alebo sa môžu vhodným spôsobom pridávať počas kultivácie.

Na kontrolu pH kultúry sa vhodne používajú zásadité zlúčeniny, ako je hydroxid sodný, hydroxid draselný, amoniak, poprípade amoniaková voda, alebo kyslé zlúčeniny, ako je kyselina fosforečná alebo kyselina sírová. Na kontrolu tvorby peny sa môžu používať odpeňovadlá, ako napríklad polyglykolestery mastných kyselín. Na udržiavanie stability plazmidov sa môžu k médiu pridávať vhodné selektívne pôsobiace látky, napríklad antibiotiká. Aby sa udržiavali aeróbne podmienky, zavádza sa ku kultúre kyslík alebo zmesi plynov obsahujúce kyslík, napríklad vzduch. Teplota pri kultivácii je zvyčajne približne 20 °C až 45 °C a najmä približne 25 °C až 40 °C. Kultivácia prebieha tak dlho, kým sa nevytvorí maximum požadovaného produktu. Tento cieľ sa zvyčajne dosiahne za 10 hodín až 160 hodín.

Metódy stanovenia L-aminokyselín sú známe zo stavu techniky. Analýza sa môže uskutočňovať anexovou chromatografiou s následnou ninhydrínovou derivatizáciou tak, ako sa opisuje v Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190), alebo sa môže uskutočňovať pomocou HPLC v obrátenej fáze (reversed phase HPLC), ako sa opisuje v Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174).

Nasledovný mikroorganizmus bol uložený v Nemeckej zbierke mikroorganizmov a bunkových kultúr (DSMZ, Braunschweig, Nemecko) podľa Budapeštianskej zmluvy:

- kmeň *Escherichia coli* DH5 α mcr/pK18mobglyA' ako DSM 13170.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Predložený vynález sa v nasledovnom texte bližšie vysvetľuje na základe príkladov uskutočnenia.

Izolácia plazmidovej DNA z *Escherichia coli* a všetky techniky reštrikcie, úpravy Klenowovou a alkalickou fosfatázou sa uskutočnili podľa Sambrook et al. (Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press). Transformácia *Escherichia coli* sa uskutočnila, pokiaľ sa neopisuje inak, podľa Chung et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1989) 86: 2172-2175).

Príklad 1

Klonovanie a sekvenovanie génu glyA z *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

Gén glyA sa klonoval v klonovacom vektore pUC18 *E. coli* (Norrandet et al., Gene (1983) 26: 101-106, Roche Diagnostics, Mannheim, Nemecko). Klonovanie sa uskutočňovalo v dvoch krokoch. Najskôr sa polymerázovou reťazovou reakciou (PCR) amplifikoval gén z *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 prostredníctvom nasledovného oligonukleotidového

priméru odvodeného z japonského zverejneného spisu JP-A-08107788.

glyA1-forward (dopredu):

5'-GCT TGC AGC GTT TTG CTC TGC C-3'

glyA1-reverse (naspäť):

5'-ACC CGT AAC CTC TTC CAC ATA GG-3'

PCR reakcia sa uskutočňovala v 30 cykloch v prítomnosti 200 μ M deoxynukleotidtrifosfátov (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 μ M príslušného oligonukleotidu, 100 ng chromozómovej DNA z *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, 1/10 objemu 10-krát koncentrovaného reakčného tlmivého roztoku a 2,6 jednotiek tepelne stabilnej zmesi Taq-/Pwo-DNA-polymerázy (Expand High Fidelity PCR System od firmy Roche Diagnostics, Mannheim, Nemecko) v zariadení Thermocycler (PTC-100, MJ Research, Inc., Watertown, USA) za nasledovných podmienok: 30 sekúnd pri 94 °C, 1 minúta pri 64 °C a 3 minúty pri 68 °C.

Amplifikovaný fragment s veľkosťou približne 1,7 kb sa potom následne ligoval pomocou SureClone Ligation Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Švédsko) podľa údajov výrobcu do štiepneho miesta SmaI vektora pUC18. Pomocou celkovej ligačnej zmesi sa kmeň *E. coli* DH5 α mc (Grant et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1990) 87: 4645-4649) transformoval. Transformanty sa identifikovali na základe svojej rezistencie na karbenicilín na agarových platniach LB obsahujúcich 50 μ g/mL karbenicilínu. Zo 7 transformantov sa preparovali plazmidy a reštrikčnou analýzou sa preskúmali

na prítomnosť 1,7 kb PCR-fragmentu ako inzertu. Takto vzniknutý rekombinantný plazmid sa ďalej označuje ako pUC18glyA.

Nukleotidová sekvencia PCR-fragmentu s veľkosťou 1,7 kb v plazmide pUC18glyA sa stanovila podľa dideoxymetódy ukončenia reťazca od Sangera et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1977) 74: 5463-5467). Na to sa celý inzert pUC18glyA sekvenoval pomocou nasledovných primérov.

Univerzálny primér:

5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'

Reverzný primér:

5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3'

Získané nukleotidové sekvencie sa analyzovali pomocou programového balíka Lasergene (Biocomputing Software for Windows, DNASTAR, Madison, USA). Analýza poskytla identifikáciu otvoreného čítacieho rastra s dĺžkou 1 302 bp. Príslušný gén sa označil ako gén glyA. Príslušný génový produkt obsahuje 434 aminokyselín a je znázornený ako SEQ ID No 4.

Príklad 2

Konštrukcia vektora na zníženú expresiu glyA

Z plazmidu pUC18glyA opísaného v príklade 1 sa pomocou reštrikčných enzýmov EcoRI a TfiI vyštíepil fragment DNA s veľkosťou 1 418 bp, ktorý obsahuje gén glyA bez vlastnej promótorovej oblasti. 5'- a 3'-konce tohto fragmentu sa

upravili Klenowovým enzýmom. Výsledný fragment DNA sa ligoval s defosforylovaným vektorom pVWEx2, ktorý bol predtým pomocou BamHI linearizovaný a upravený Klenowovým enzýmom (Wendisch, „Physiologische und NMR-spektroskopische Untersuchungen zur in vivo-Aktivität zentraler Stoffwechselwege im Wildstamm und in rekombinanten Stämmen von *Corynebacterium glutamicum*“, správa Výskumného centra Jülich, Jül-3397, ISSN09442952, Jülich, Nemecko, 1997), aby gén glyA s rovnakou orientáciou ležal bezprostredne za promótorom tac vektora, indukovateľným pomocou izopropyl- β -D-tiogalaktozidu (IPTG). Pomocou celkovej ligačnej zmesi sa kmeň *E. coli* DH5 α mc (Grant et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1990) 87: 4645-4649) transformoval. Transformanty sa identifikovali na základe svojej rezistencie na tetracyklín na agarových platniach LB obsahujúcich 15 μ g/mL tetracyklínu. Z 12 transformantov sa preparovali plazmidy a reštrikčnou analýzou sa preskúmali na prítomnosť 1 418 bp fragmentu ako inzertu so správnou orientáciou vzhľadom na promótor tac. Takto vzniknutý rekombinantný plazmid sa v ďalšom texte označuje pVWEx2glyA.

Z plazmidu pVWEx2glyA sa potom polymerázovou reťazovou reakciou (PCR) pomocou nasledovných oligonukleotidových primérov amplifikoval fragment DNA, ktorý obsahuje lacI, gén pre represor promótoru tac, promótor tac a prvých 438 bp klonovaného génu glyA z *Corynebacterium glutamicum*.

glyA2-forward (dopredu) (s pripojenou rozpoznávacou sekvenciou EcoRI, vyznačenou podčiarknutím):

5'-CCG GAA TTC TCA CTG CCC GCT TTC CAG TC-3'

glyA2-reverse (naspäť) (s pripojenou rozpoznávacou sekvenciou BamHI, vyznačenou podčiarknutím)

5'-CGG GAT CCC AGC TTT CCG GAG AAG TTC AAC-3'

PCR reakcia sa uskutočňovala v 30 cykloch v prítomnosti 200 μ M deoxynukleotidtrifosfátov (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 μ M príslušného oligonukleotidu, 100 ng plazmidovej DNA pVWEx2glyA, 1/10 objemu 10-krát koncentrovaného reakčného tlmivého roztoku a 2,6 jednotiek tepelne stabilnej zmesi Taq-/Pwo-DNA-polymerázy (Expand High Fidelity PCR System od firmy Roche Diagnostics, Mannheim, Nemecko) v zariadení Thermocycler (PTC-100, MJ Research, Inc., Watertown, USA) za nasledovných podmienok: 30 sekúnd pri 94 °C, 30 sekúnd pri 58 °C a 2 minúty pri 72 °C.

Amplifikovaný fragment s veľkosťou približne 2,0 kb sa potom natrávil pomocou EcoRI a BamHI, izoloval pomocou NucleoSpin Extract 2 in 1 Kit od firmy Macherey-Nagel (Düren, Nemecko) podľa údajov výrobcu a potom ligoval do defosforylovaného vektora pK18mob (Schäfer et al., Gene (1994) 145: 69-73), taktiež štiepeného pomocou EcoRI a BamHI. Pomocou celkovej ligačnej zmesi sa kmeň *E. coli* DH5 α mc^r (Grant et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1990) 87: 4645-4649) transformoval. Transformanty sa identifikovali na základe svojej rezistencie na kanamycín na agarových platinách LB obsahujúcich 50 μ g/mL kanamycínu. Z 12 transformantov sa preparovali plazmidy a reštrikčnou analýzou sa preskúmali na prítomnosť 2,0 kb PCR-fragmentu ako inzertu. Takto vzniknutý rekombinantný plazmid sa ďalej označuje pK18mobglyA' (viď obrázok 1).

Príklad 3

Konštrukcia kmeňa *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032::pK18mobglyA' so zníženou, regulovateľnou expresiou glyA

Elektroporáciou (Haynes et al., FEMS Microbiology Letters (1989) 61: 329-334) sa prázdny vektor pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554) a plazmid pK18mobglyA' opísaný v príklade 2 vložili do kmeňa divého typu *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 (Abe et al., Journal of General and Applied Microbiology (1967) 13: 279-301).

Po transformácii pomocou pZ1 sa transformanty identifikovali na základe svojej rezistencie na kanamycín na agarových platniach LBHIS obsahujúcich 15 µg/mL kanamycínu (Liebl et al., FEMS Microbiology Letters (1989) 65: 299-304). Z 3 transformantov sa pripravili plazmidy a reštrikčnou analýzou preskúmali na prítomnosť prázdneho vektora pZ1. Týmto spôsobom vznikol kontrolný kmeň *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032/pZ1.

Po transformácii s pK18mobglyA' sa musel plazmid integrovať homológou rekombináciou klonovaného 5'-konca glyA do chromozómu *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032. Získané klony rezistentné na kanamycín sa identifikovali na agarových platniach LBHIS obsahujúcich 15 µg/mL kanamycínu a 1 mM izopropyl-β-D-tiogalaktozidu (IPTG) (Liebl et al., FEMS Microbiology Letters (1989) 65: 299-304). Správna integrácia pK18mobglyA' v chromozóme sa preskúmala v 2 získaných integračných mutantoch polymerázovou reťazovou reakciou (PCR) pomocou nasledovných oligonukleotidových klonov.

Reverzný primér (RSP):

5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3'

glyA2-reverzný:

5'-CGG GAT CCC AGC TTT CCG GAG AAG TTC AAC-3'

PCR reakcia sa uskutočňovala v 30 cykloch v prítomnosti 200 μ M deoxynukleotidtrifosfátov (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 μ M príslušného oligonukleotidu, 100 ng chromozómovej DNA z *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032::pK18mobglyA', 1/10 objemu 10-krát koncentrovaného reakčného tlmivého roztoku a 2,6 jednotiek tepelne stabilnej zmesi Taq-/Pwo-DNA-polymerázy (Expand High Fidelity PCR System od firmy Roche Diagnostics, Mannheim, Nemecko) v zariadení Thermocycler (PTC-100, MJ Research, Inc., Watertown, USA) za nasledovných podmienok: 30 sekúnd pri 94 °C, 30 sekúnd pri 48 °C a 2 minúty pri 72 °C. Týmto spôsobom vznikol kmeň *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032::pK18mobglyA', v ktorom sa nachádza gén glyA pod kontrolou promótora tac indukovateľného izopropyl- β -D-tiogalaktózidom (IPTG).

Príklad 4

Stanovenie serínhydroxymetyltransferázovej aktivity kódovanej génom glyA v kmeni *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032::pK18mobglyA'

Na získanie surových extraktov na stanovenie serínhydroxymetyltransferázovej aktivity kódovanej génom glyA sa kmene *C. glutamicum* ATCC13032/pZ1 a *C. glutamicum* ATCC13032::pK18mobglyA', opísané v príklade 3, 14 hodín pri 30 °C predbežne kultivovali v 100 mL mozgovo-srdcového infúzneho média (Difco Laboratories, Detroit, USA) s 25 μ g

kanamycínu na 1 mL a 100 μM izopropyl- β -D-tiogalaktozidu (IPTG). Následne sa bunky jedenkrát premyli 0,9% (w/v (hmotnosť/objem)) roztokom chloridu sodného a touto suspenziou sa naočkovalo 100 mL média CgXII tak, aby OD_{600} (optická hustota pri 600 nm) bola 0,5. Médium bolo identické s médiom opísaným v Keilhauer et al. (Journal of Bacteriology (1993) 175: 5593-5603), obsahovalo však prídavne 25 μg kanamycínu na 1 mL a 0, 10 alebo 100 μM izopropyl- β -D-tiogalaktozidu (IPTG). Zloženie média opísaného Keilhauerom et al. je uvedené v tabuľke 1.

Tabuľka 1

Zloženie média CGXII

Zložka	Koncentrácia
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20 g/L
Močovina	5 g/L
KH_2PO_4	1 g/L
K_2HPO_4	1 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25 g/L
Kyselina 3-morfolinopropán-sulfónová	42 g/L
CaCl_2	10 mg/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 mg/L
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10 mg/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mg/L
CuSO_4	0,2 mg/L
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,02 mg/L
Biotín	0,2 mg/L
Glukóza	40 g/L
Kyselina protokatechová	30 mg/L

Kultivácia obidvoch kmeňov sa uskutočňovala pri 30 °C. Po 10 hodinách sa bunky jedenkrát premyli 50mM tlmivým roztokom zloženým z kyseliny 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazín-etánsulfónovej a hydroxidu sodného (pH 7,0), odstredili (10 minút pri 5 000 otáčok za minútu pomocou Minifuge RF od firmy Heraeus, Osterode, Nemecko) a resuspendovali v 200mM tlmivom roztoku zloženom z kyseliny 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazín-etánsulfónovej a hydroxidu sodného (pH 7,0) tak, aby konečný objem bol 5 mL. K tejto suspenzii buniek sa pridalo 50 µl 2mM roztoku pyridoxál-5-fosfátu a 50 µl 100mM roztoku ditiotreitolu a bunky sa rozbili. Rozbitie buniek sa uskutočnilo pri 0 °C pomocou ultrazvukového dezintegrátora (Branson Sonifier W-250, Branson Sonic Power Co, Danbury, USA; trvanie pôsobenia ultrazvuku 6 minút, šírka pulzu 100 %, intenzita ultrazvuku 2,5). Po úprave ultrazvukom sa úlomky buniek oddelili odstredením (30 minút pri 4 °C a 13 000 otáčok za minútu v chladenej centrifúge Sigma 202 MK od firmy Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Nemecko). Supernatant sa ako surový extrakt zbavený buniek použil priamo na stanovenie enzýmovej aktivity.

Stanovenie proteínov v surových extraktoch zbavených buniek sa uskutočnilo fotometricky podľa Bensadouna a Weinsteina (Analytical Biochemistry (1976) 70: 241-250). Obsah proteínov sa pritom stanovil pomocou kalibračnej krivky vytvorenej pomocou hovädzieho sérového albumínu ako štandardu.

Na stanovenie aktivity serínhydroxymetyltransferázy v surových extraktoch zbavených buniek sa použil diskontinuálny enzýmový test, pri ktorom sa kvantifikoval glycín vytvorený zo substrátu treonínu. Reakčné vzorky sa 15 minút pri 37 °C inkubovali v nasledovnej zmesi (modifikované podľa

Scrimgeoura a Huennekens, *Methods in Enzymology* (1962), zv. V: 838-843, Academic Press): 20 mM treonínu, 200 μ M pyridoxál-5-fosfátu, 900 μ M tetrahydrofolátu, 100 mM tlmivého roztoku zloženého z kyseliny 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazín-etánsulfónovej a hydroxidu sodného (pH 7,0) a 1,0 až 1,5 mg proteínu (zo surového extraktu) vo výslednom objeme 1 mL. Reakcia sa prerušila pridaním 0,25 objemu 25% (w/v (hmotnosť/objem)) roztoku kyseliny trichlóroctovej, vzorky sa inkubovali 15 minút pri 0 °C a denaturovaný proteín sa odstredil (15 minút pri 4 °C a 13 000 otáčok za minútu v chladenej centrifúge Sigma 202 MK od firmy Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Nemecko). Kvantitatívne stanovenie glycínu zo supernatantu, vytvoreného v enzýmovom teste, sa uskutočnilo pomocou HPLC v obrátenej fáze (reversed phase HPLC) (Lindroth et al., *Analytical Chemistry* (1979) 51: 1167-1174). Použil sa prístroj HPLC série HP1100 (Hewlett-Packard, Waldbronn, Nemecko) s pripojeným fluorescenčným detektorom (G1321A); riadenie systému a vyhodnotenie údajov sa uskutočnilo pomocou HP-Chem-Station (Hewlett-Packard). 1 μ L analyzovaného roztoku aminokyseliny sa zmiešal v automatickej derivatizácii v predkolóne s 20 μ L hotového činidla orto-ftalaldehyd/2-merkaptóetanol (Pierce Europe BV, Oud-Beijerland, Holandsko). Pritom vzniknuté fluoreskujúce tiosubstituované izoindoly (Jones et al., *Journal of Chromatography* (1983) 266: 471-482) sa delili v kombinovanej predkolóne (40x4 mm Hypersil ODS 5) a hlavnej kolóne (Hypersil ODS 5, obidve kolóny od firmy CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Nemecko) s gradientovým programom s pribúdajúcou nepolárnou fázou (metanol). Polárnym eluentom bol acetát sodný (0,1M, pH 7,2); prietok bol 0,8 mL za minútu. Fluorescenčná detekcia derivatizovaných aminokyselín sa uskutočňovala pri excitačnej vlnovej dĺžke 230 nm a emisnej vlnovej dĺžke 450 nm. Koncentrácie glycínu sa

vypočítali porovnaním s externým štandardom a asparagínom ako prídavným interným štandardom.

Výsledky enzýmového testu s treonínom ako substrátom sú uvedené v tabuľke 2.

Tabuľka 2

Kmeň	Koncentrácia IPTG (μ M)	Serínhydroxymetyltrans- ferázová aktivita (nmol glycín/minúta/mg proteínu)
ATCC13032/pZ1	0	0,9
ATCC13032::pK18mobglyA'	0	0,3
	10	0,7
	100	1,6

Príklad 5

Konštrukcia kmeňa *Brevibacterium flavum*

DM368-2::pK18mobglyA' so zníženou, regulovateľnou expresiou glyA

Elektroporáciou (Haynes et al., FEMS Microbiology Letters (1989) 61: 329-334) sa prázdny vektor pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554) a plazmid pK18mobglyA' opísaný v príklade 2 vložili do kmeňa *Brevibacterium flavum* DM368-2 produkujúceho treonín. Kmeň DM368-2 sa opisuje v EP-B-0 385 940 a je uložený ako DSM5399.

Po transformácii pomocou pZ1 sa transformanty identifikovali na základe svojej rezistencie na kanamycín na agarových platniach LBHIS obsahujúcich 15 µg/mL kanamycínu (Liebl et al., FEMS Microbiology Letters (1989) 65: 299-304). Z 3 transformantov sa pripravili plazmidy a reštrikčnou analýzou preskúmali na prítomnosť prázdneho vektora pZ1. Týmto spôsobom vznikol kontrolný kmeň *Brevibacterium flavum* DM368-2/pZ1.

Po transformácii pomocou pK18mobglyA' sa musel plazmid integrovať homológnu rekombináciou klonovaného 5'-konca glyA do chromozómu *Brevibacterium flavum* DM368-2. Získané klony rezistentné na kanamycín sa identifikovali na agarových platniach LBHIS obsahujúcich 15 µg/mL kanamycínu a 1 mM izopropyl-β-D-tiogalaktózidu (IPTG) (Liebl et al., FEMS Microbiology Letters (1989) 65: 299-304). Správna integrácia pK18mobglyA' v chromozóme sa preskúmala v 4 získaných integračných mutantoch polymerázovou reťazovou reakciou (PCR), ako už bolo opísané v príklade 3, so 100 ng chromozómovej DNA z *Brevibacterium flavum* DM368-2::pK18mobglyA' ako templátom. Týmto spôsobom vznikol kmeň *Brevibacterium flavum* DM368-2::pK18mobglyA', v ktorom sa nachádza gén glyA pod kontrolou promótoru tac indukovateľného izopropyl-β-D-tiogalaktózidom (IPTG).

Príklad 6

Stanovenie serínhydroxymetyltransferázovej aktivity kódovanej génom glyA v kmeni *Brevibacterium flavum* DM368-2::pK18mobglyA'

Získanie surových extraktov na stanovenie serínhydroxymetyltransferázovej aktivity kódovanej génom glyA v kmeňoch

B. flavum DM368-2/pZ1 a *B. flavum* DM368-2::pK18mobglyA', opísaných v príklade 5, sa uskutočnilo tak, ako sa už opísalo v príklade 4. Stanovenie proteínov v získaných surových extraktoch zbavených buniek a diskontinuálny enzýmový test, pri ktorom sa kvantifikuje glycín vytvorený zo substrátu treonínu, sa taktiež uskutočnili tak, ako sa už opísalo v príklade 4.

Výsledky tohto enzýmového testu s treonínom ako substrátom sú uvedené v tabuľke 3.

Tabuľka 3

Kmeň	Koncentrácia IPTG (μ M)	Serínhydroxymetyltrans- ferázová aktivita (nmol glycín/minúta/mg proteínu)
DM368-2/pZ1	0	1,6
DM368-2::pK18mobglyA'	0	<0,1
	10	0,8
	100	1,7

Príklad 7

Príprava L-treonínu pomocou *Brevibacterium flavum*

Na preskúmanie tvorby treonínu sa kmene *B. flavum* DM368-2/pZ1 a DM368-2::pK18mobglyA', opísané v príklade 5, predbežne kultivovali 14 hodín pri 30 °C v 100 mL mozgovo-srdcového infúzneho média (Difco Laboratories, Detroit, USA)

s 25 µg kanamycínu na 1 mL a 100 µM izopropyl-β-D-tiogalaktozidu (IPTG). Následne sa bunky jedenkrát premyli 0,9% (w/v (hmotnosť/objem)) roztokom chloridu sodného a touto suspenziou sa naočkovalo 60 mL média CgXII tak, aby OD₆₀₀ (optická hustota pri 600 nm) bola 0,5. Médium bolo identické s médiom opísaným v Keilhauer et al. (Journal of Bacteriology (1993) 175: 5593-5603), obsahovalo však prídavne 25 µg kanamycínu na mL a 0, 10 alebo 100 µM izopropyl-β-D-tiogalaktozidu (IPTG).

Kultivácia obidvoch kmeňov sa uskutočňovala 72 hodín pri 30 °C. Po 48 a 72 hodinách sa odobrali vzorky a bunky sa krátko odstredovali (5 minút pri 13 000 otáčok za minútu pomocou Biofuge pico od firmy Heraeus, Osterode, Nemecko).

Kvantitatívne stanovenie extracelulárnych koncentrácií aminokyseliny v supernatante z kultivácie sa uskutočňovalo pomocou HPLC v obrátenej fáze (reversed phase HPLC) (Lindroth et al., Analytical chemistry (1979) 51: 1167-1174), ako sa už opísalo v príklade 4. Koncentrácie treonínu sa vypočítali porovnaním s externým štandardom a asparagínom ako doplnkovým interným štandardom.

Výsledky sú uvedené v tabuľke 4.

Tabuľka 4

Kmeň	Koncentrácia IPTG µM	L-Treonín (g/l)	
		48 hodín	72 hodín
DM368-2/pZ1	0	1,27	1,32
DM368-2::pK18mobglyA'	10	1,32	1,44
	0	1,41	1,60

Prehľad obrázkov na výkresoch

Priložený je nasledovný obrázok:

Obrázok 1: Mapa plazmidu pK18mobglyA'.

Dĺžkové údaje treba chápať ako približné údaje.

Použité skratky a značky majú nasledovný význam:

BamHI:	reštrikčná endonukleáza z <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
BglII:	reštrikčná endonukleáza z <i>Bacillus globigii</i>
BstEII:	reštrikčná endonukleáza z <i>Bacillus stearothermophilus</i>
EcoRI:	reštrikčná endonukleáza z <i>Escherichia coli</i>
EcoRV:	reštrikčná endonukleáza z <i>Escherichia coli</i>
HindIII:	reštrikčná endonukleáza z <i>Haemophilus influenzae</i>
SacI:	reštrikčná endonukleáza zo <i>Streptomyces achromogenes</i>
kan:	gén pre rezistenciu na kanamycín
lac ^q :	gén pre represor tac-promótora Ptac
Ptac:	tac-promótor
glyA':	5'-úsek génu pre serínhydroxymetyltransferázu
glyA2-reverse:	primér na preskúmanie integrácie
RSP:	reverzný štandardný primér na preskúmanie integrácie

Protokol sekvencií

<110> Degussa-Hüls AG
Forschungszentrum Jülich GmbH

<120> Spôsob fermentačnej výroby L-aminokyselín
použitím koryneformných baktérií

<130> 990200 BT

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 438

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum ATCC13032

<220>

<221> N_región

<222> (1)..(438)

<223> 5'glyA

<400> 1

```
atgaccgatg cccaccaagc ggacgatgtc cgttaccagc cactgaacga gcttgatcct 60
gaggtggctg ctgccatcgc tggggaactt gcccgtaac gcgatacatt agagatgatc 120
gcgtctgaga acttcgttcc ccgttctgtt ttgcaggcgc agggttctgt tcttaccaat 180
aagtatgccg agggttaccc tggccgccgt tactacggtg gttgcgaaca agttgacatc 240
attgaggatc ttgcacgtga tcgtgcgaag gctctcttcg gtgcagagtt cgccaatgtt 300
cagcctcact ctggcgacac ggctaattgt gctgtgctga tgactttggc tgagccaggc 360
gacaagatca tgggtctgtc tttggctcat ggtggtcact tgacccacgg aatgaagttg 420
aacttctccg gaaagctg                                     438
```

<210> 2

<211> 2000

<212> DNA

<213> Umeľá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie:
lacI-tac-5'glyA

<220>

<221> gén

<222> Doplnok ((6)..(1097))

<223> lacI

<220>

<221> Promótor

<222> (1391)..(1434)

<223> tac

<220>

<221> N_región

<222> (1562)..(1999)

<223> 5'glyA

<400> 2

```

aattctcact gcccgctttc cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg 60
gccaacgcgc ggggagaggg gggttgcgta ttgggcgccca ggggtggtttt tcttttcacc 120
agtgagacgg gcaacagctg attgcccttc accgcctggc cctgagagag ttgcagcaag 180
cgggtccacgc tggtttgccc cagcaggcga aaatcctgtt tgatggtggt tgacggcggg 240
atataacatg agctgtcttc ggtatcgctg tatccacta ccgagatata cgcaccaacg 300
cgcagccccg actcggtaat ggcgcgcatt gcgccagcg ccatctgata gttggcaacc 360
agcatcgcat tgggaacgat gccctcattc agcatttgca tggtttggtg aaaaccggac 420
atggcactcc agtcgccttc ccgttcgcgt atcggctgaa tttgattgct agtgagatat 480
ttatgccagc cagccagacg cagacgcgcc gagacagaac ttaatggggc cgctaaccagc 540
gcgatttgct ggtgacccaa tgcgaccaga tgctccacgc ccagtcgcgt accgtcttca 600
tgggagaaaa taatactggt gatgggtgtc tggtcagaga catcaagaaa taacgccgga 660
acattagtgc aggcagcttc cacagcaatg gcactcctgt catccagcgg atagttaatg 720
atcagccccac tgacgcgttg cgcgagaaga ttgtgcaccg ccgctttaca ggcttcgacg 780
ccgcttcggt ctaccatcga caccaccacg ctggcaccca gttgatcggc gcgagattta 840
atcgcccgca caatttcga cggcgcgtgc agggccagac tggaggtggc aacgccaatc 900
agcaacgact gtttgccgcg cagttgttgt gccacgcggt tgggaatgta attcagctcc 960
gccatcgccg cttccacttt tcccgcgtt ttcgcagaaa cgtggctggc ctggttcacc 1020
acgcgggaaa cggctctgata agagacaccg gcatactctg cgacatcgta taacgttact 1080
ggtttcacat tcaccaccct gaattgactc tcttcggggc gctatcatgc cataccgcga 1140
aagggtttgc accattcgat ggtgtcaacg taaatgcatg ccgcttcgcc ttcgcgcgcg 1200
aattgcaagc tgatccgggc ttatcgactg cacggtgcac caatgcttct ggcgtcaggc 1260
agccatcgga agctgtggta tggctgtgca ggtcgtaaat cactgcataa ttcgtgtcgc 1320
tcaaggcgca ctcccgttct ggataatgtt ttttgcccg acatcataac ggttctggca 1380
aatattctga aatgagctgt tgacaattaa tcatcggtc gtataatgtg tggaaattgtg 1440
agcggataac aatttcacac aggaaacaga attaaaagat atgaccatga ttacgccaa 1500
cttgcatgcc tgcaggtcga ctctagagga tcattcgtct tgtgaaagg tagctgacct 1560
gatgaccgat gccaccaag cggacgatgt ccgttaccag ccactgaacg agcttgatcc 1620
tgaggtggct gctgccatcg ctggggaact tgcccgtcaa cgcgatacat tagagatgat 1680
cgcgtctgag aacttcgttc cccgttctgt tttgcaggcg cagggttctg ttcttacc 1740
taagtatgcc gagggttacc ctggccgcgg ttactacggt ggttgcaaac aagtgtacat 1800
cattgaggat cttgcacgtg atcgtgcgaa ggctctcttc ggtgcagagt tcgccaatgt 1860
tcagcctcac tctggcgcac aggctaattg tgctgtgctg atgactttgg ctgagccagg 1920
cgacaagatc atgggtctgt ctttggtcga tgggtgtcac ttgaccacg gaatgaagtt 1980
gaacttctcc ggaaagctgg                                     2000

```

<210> 3

<211> 2866

<212> DNA

<213> Umeľá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: lacI-tac-glyA-tac-glyA

<220>

<221> gén

<222> Doplnok : ((6)..(1097))

<223> lacI

<220>

<221> Promótor

<222> (1391)..(1434)

<223> tac

<220>

<221> CDS

<222> (1562)..(2863)

<223> glyA

<400> 3

```

aattctcact gcccgcttcc cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg 60
gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgcca gggtaggttt tcttttcacc 120
agtgagacgg gcaacagctg attgcccttc accgcctggc cctgagagag ttgcagcaag 180
cgggtccacgc tggtttgccc cagcaggcga aaatcctgtt tgatgggtgg tgacggcggg 240
atataacatg agctgtcttc ggtatcgtcg tatccacta ccgagatata cgcaccaacg 300
cgcagcccg gactcggtaat ggcgcgcatt gcgccagcg ccatctgata gttggcaacc 360
agcatcgagc tgggaacgat gccctcattc agcatttgca tggtttggtg aaaaccggac 420
atggcactcc agtcgccttc ccgttcgctc atcggtgaa tttgattgcg agtgagatat 480
ttatgccagc cagccagacg cagacgcgcc gagacagaac ttaatgggcc cgctaacagc 540
gcgatttgct ggtgacccaa tgcgaccaga tgctccacgc ccagtcgcgt accgtcttca 600
tgggagaaaa taatactgtt gatgggtgtc tggtcagaga catcaagaaa taacgccgga 660
acattagtgc aggcagcttc cacagcaatg gcacctggt catccagcgg atagttaatg 720
atcagcccac tgacgcgttg cgcgagaaga ttgtgcaccg ccgctttaca ggcttcgacg 780
ccgcttcgtt ctaccatcga caccaccacg ctggcaccca gttgatcggc gcgagattta 840
atcgcccgca caatttgca cggcgcgtgc agggccagac tggaggtggc aacgccaatc 900
agcaacgact gtttgccgcg cagttgttgt gccacgcggt tgggaatgta attcagctcc 960
gccatcgccg ctccactttt tcccgcgtt ttcgcagaaa cgtggctggc ctggttcacc 1020
acgcgggaaa cggcttgata agagacaccg gcatactctg cgacatcgta taacgttact 1080
ggtttcacat tcaccacct gaattgactc tcttcgggc gctatcatgc cataccgca 1140
aaggttttgc accattcgat ggtgtcaacg taaatgcatg ccgcttcgcc ttcgcgcgcg 1200
aattgcaagc tgatccgggc ttatcgactg cacggtgcac caatgcttct ggcgtcaggc 1260
agccatcgga agctgtggta tggctgtgca ggtcgtaaat cactgcataa ttcgtgtcgc 1320
tcaaggcgca ctcccgttct ggataatgtt ttttgcgccg acatcataac ggttctggca 1380
aatattctga aatgagctgt tgacaattaa tcatcggctc gtataatgtg tgggaattgtg 1440
agcggataac aatttcacac aggaaacaga attaaaagat atgacatga ttacgccaag 1500
cttgcattgc tgcaggtcga ctctagagga tcattcgtct tgtgaaaggc tagctgacct 1560

```

```

g atg acc gat gcc cac caa gcg gac gat gtc cgt tac cag cca ctg aac 1609
Met Thr Asp Ala His Gln Ala Asp Asp Val Arg Tyr Gln Pro Leu Asn
  1             5             10             15

gag ctt gat cct gag gtg gct gct gcc atc gct ggg gaa ctt gcc cgt 1657
Glu Leu Asp Pro Glu Val Ala Ala Ala Ile Ala Gly Glu Leu Ala Arg
          20             25             30

caa cgc gat aca tta gag atg atc gcg tct gag aac ttc gtt ccc cgt 1705
Gln Arg Asp Thr Leu Glu Met Ile Ala Ser Glu Asn Phe Val Pro Arg
          35             40             45

tct gtt ttg cag gcg cag ggt tct gtt ctt acc aat aag tat gcc gag 1753
Ser Val Leu Gln Ala Gln Gly Ser Val Leu Thr Asn Lys Tyr Ala Glu
          50             55             60

ggt tac cct ggc cgc cgt tac tac ggt ggt tgc gaa caa gtt gac atc 1801
Gly Tyr Pro Gly Arg Arg Tyr Tyr Gly Gly Cys Glu Gln Val Asp Ile
          65             70             75             80

att gag gat ctt gca cgt gat cgt gcg aag gct ctc ttc ggt gca gag 1849
Ile Glu Asp Leu Ala Arg Asp Arg Ala Lys Ala Leu Phe Gly Ala Glu
          85             90             95

ttc gcc aat gtt cag cct cac tct ggc gca cag gct aat gct gct gtg 1897
Phe Ala Asn Val Gln Pro His Ser Gly Ala Gln Ala Asn Ala Ala Val
          100             105             110

ctg atg act ttg gct gag cca ggc gac aag atc atg ggt ctg tct ttg 1945
Leu Met Thr Leu Ala Glu Pro Gly Asp Lys Ile Met Gly Leu Ser Leu
          115             120             125

gct cat ggt ggt cac ttg acc cac gga atg aag ttg aac ttc tcc gga 1993
Ala His Gly Gly His Leu Thr His Gly Met Lys Leu Asn Phe Ser Gly
          130             135             140

aag ctg tac gag gtt gtt gcg tac ggt gtt gat cct gag acc atg cgt 2041
Lys Leu Tyr Glu Val Val Ala Tyr Gly Val Asp Pro Glu Thr Met Arg
          145             150             155             160

gtt gat atg gat cag gtt cgt gag att gct ctg aag gag cag cca aag 2089
Val Asp Met Asp Gln Val Arg Glu Ile Ala Leu Lys Glu Gln Pro Lys
          165             170             175

gta att atc gct ggc tgg tct gca tac cct cgc cac ctt gat ttc gag 2137
Val Ile Ile Ala Gly Trp Ser Ala Tyr Pro Arg His Leu Asp Phe Glu
          180             185             190

gct ttc cag tct att gct gcg gaa gtt ggc gcg aag ctg tgg gtc gat 2185
Ala Phe Gln Ser Ile Ala Ala Glu Val Gly Ala Lys Leu Trp Val Asp
          195             200             205

atg gct cac ttc gct ggt ctt gtt gct gct ggt ttg cac cca agc cca 2233
Met Ala His Phe Ala Gly Leu Val Ala Ala Gly Leu His Pro Ser Pro
          210             215             220

```

gtt cct tac tct gat gtt gtt tct tcc act gtc cac aag act ttg ggt	2281
Val Pro Tyr Ser Asp Val Val Ser Ser Thr Val His Lys Thr Leu Gly	
225 230 235 240	
gga cct cgt tcc ggc atc att ctg gct aag cag gag tac gcg aag aag	2329
Gly Pro Arg Ser Gly Ile Ile Leu Ala Lys Gln Glu Tyr Ala Lys Lys	
245 250 255	
ctg aac tct tcc gta ttc cca ggt cag cag ggt ggt cct ttg atg cac	2377
Leu Asn Ser Ser Val Phe Pro Gly Gln Gln Gly Gly Pro Leu Met His	
260 265 270	
gca gtt gct gcg aag gct act tct ttg aag att gct ggc act gag cag	2425
Ala Val Ala Ala Lys Ala Thr Ser Leu Lys Ile Ala Gly Thr Glu Gln	
275 280 285	
ttc cgt gac cgt cag gct cgc acg ttg gag ggt gct cgc att ctt gct	2473
Phe Arg Asp Arg Gln Ala Arg Thr Leu Glu Gly Ala Arg Ile Leu Ala	
290 295 300	
gag cgt ctg act gct tct gat gcg aag gcc gct ggc gtg gat gtc ttg	2521
Glu Arg Leu Thr Ala Ser Asp Ala Lys Ala Ala Gly Val Asp Val Leu	
305 310 315 320	
acc ggt ggc act gat gtg cac ttg gtt ttg gct gat ctg cgt aac tcc	2569
Thr Gly Gly Thr Asp Val His Leu Val Leu Ala Asp Leu Arg Asn Ser	
325 330 335	
cag atg gat ggc cag cag gcg gaa gat ctg ctg cac gag gtt ggt atc	2617
Gln Met Asp Gly Gln Gln Ala Glu Asp Leu Leu His Glu Val Gly Ile	
340 345 350	
act gtg aac cgt aac gcg gtt cct ttc gat cct cgt cca cca atg gtt	2665
Thr Val Asn Arg Asn Ala Val Pro Phe Asp Pro Arg Pro Pro Met Val	
355 360 365	
act tct ggt ctg cgt att ggt act cct gcg ctg gct acc cgt ggt ttc	2713
Thr Ser Gly Leu Arg Ile Gly Thr Pro Ala Leu Ala Thr Arg Gly Phe	
370 375 380	
gat att cct gca ttc act gag gtt gca gac atc att ggt act gct ttg	2761
Asp Ile Pro Ala Phe Thr Glu Val Ala Asp Ile Ile Gly Thr Ala Leu	
385 390 395 400	
gct aat ggt aag tcc gca gac att gag tct ctg cgt ggc cgt gta gca	2809
Ala Asn Gly Lys Ser Ala Asp Ile Glu Ser Leu Arg Gly Arg Val Ala	
405 410 415	
aag ctt gct gca gat tac cca ctg tat gag ggc ttg gaa gac tgg acc	2857
Lys Leu Ala Ala Asp Tyr Pro Leu Tyr Glu Gly Leu Glu Asp Trp Thr	
420 425 430	
atc gtc taa	2866
Ile Val	

<210> 4

<211> 434

<212> PRT

<400> 4

```

Met Thr Asp Ala His Gln Ala Asp Asp Val Arg Tyr Gln Pro Leu Asn
  1           5           10           15

Glu Leu Asp Pro Glu Val Ala Ala Ala Ile Ala Gly Glu Leu Ala Arg
          20           25           30

Gln Arg Asp Thr Leu Glu Met Ile Ala Ser Glu Asn Phe Val Pro Arg
          35           40           45

Ser Val Leu Gln Ala Gln Gly Ser Val Leu Thr Asn Lys Tyr Ala Glu
          50           55           60

Gly Tyr Pro Gly Arg Arg Tyr Tyr Gly Gly Cys Glu Gln Val Asp Ile
          65           70           75           80

Ile Glu Asp Leu Ala Arg Asp Arg Ala Lys Ala Leu Phe Gly Ala Glu
          85           90           95

Phe Ala Asn Val Gln Pro His Ser Gly Ala Gln Ala Asn Ala Ala Val
          100          105          110

Leu Met Thr Leu Ala Glu Pro Gly Asp Lys Ile Met Gly Leu Ser Leu
          115          120          125

Ala His Gly Gly His Leu Thr His Gly Met Lys Leu Asn Phe Ser Gly
          130          135          140

Lys Leu Tyr Glu Val Val Ala Tyr Gly Val Asp Pro Glu Thr Met Arg
          145          150          155          160

Val Asp Met Asp Gln Val Arg Glu Ile Ala Leu Lys Glu Gln Pro Lys
          165          170          175

Val Ile Ile Ala Gly Trp Ser Ala Tyr Pro Arg His Leu Asp Phe Glu
          180          185          190

Ala Phe Gln Ser Ile Ala Ala Glu Val Gly Ala Lys Leu Trp Val Asp
          195          200          205

Met Ala His Phe Ala Gly Leu Val Ala Ala Gly Leu His Pro Ser Pro
          210          215          220

Val Pro Tyr Ser Asp Val Val Ser Ser Thr Val His Lys Thr Leu Gly
          225          230          235          240

Gly Pro Arg Ser Gly Ile Ile Leu Ala Lys Gln Glu Tyr Ala Lys Lys
          245          250          255

Leu Asn Ser Ser Val Phe Pro Gly Gln Gln Gly Gly Pro Leu Met His
          260          265          270

Ala Val Ala Ala Lys Ala Thr Ser Leu Lys Ile Ala Gly Thr Glu Gln
          275          280          285

Phe Arg Asp Arg Gln Ala Arg Thr Leu Glu Gly Ala Arg Ile Leu Ala
          290          295          300

```


Glu Arg Leu Thr Ala Ser Asp Ala Lys Ala Ala Gly Val Asp Val Leu
305 310 315 320

Thr Gly Gly Thr Asp Val His Leu Val Leu Ala Asp Leu Arg Asn Ser
325 330 335

Gln Met Asp Gly Gln Gln Ala Glu Asp Leu Leu His Glu Val Gly Ile
340 345 350

Thr Val Asn Arg Asn Ala Val Pro Phe Asp Pro Arg Pro Pro Met Val
355 360 365

Thr Ser Gly Leu Arg Ile Gly Thr Pro Ala Leu Ala Thr Arg Gly Phe
370 375 380

Asp Ile Pro Ala Phe Thr Glu Val Ala Asp Ile Ile Gly Thr Ala Leu
385 390 395 400

Ala Asn Gly Lys Ser Ala Asp Ile Glu Ser Leu Arg Gly Arg Val Ala
405 410 415

Lys Leu Ala Ala Asp Tyr Pro Leu Tyr Glu Gly Leu Glu Asp Trp Thr
420 425 430

Ile Val

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Spôsob fermentačnej výroby L-aminokyselín,
v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa uskutočňujú
nasledovné kroky:

- a) fermentácia koryneformných baktérií produkujúcich
žiadanú L-aminokyselinu, v ktorých sa zoslabuje aspoň
gén glyA,
- b) koncentrovanie žiadaného produktu v médiu alebo v bun-
kách baktérií a
- c) izolácia L-aminokyseliny.

2. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a
t ý m , že sa používajú baktérie, v ktorých sa prídavne
zosilňujú ďalšie gény pre biosyntetickú dráhu žiadanej
L-aminokyseliny.

3. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a
t ý m , že sa používajú baktérie, v ktorých sú aspoň čiast-
točne eliminované metabolické dráhy, ktoré znižujú tvorbu
žiadanej L-aminokyseliny.

4. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a
t ý m , že sa znižuje expresia polynukleotidu, ktorý kóduje
gén glyA.

5. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a
t ý m , že sa zoslabujú katalytické vlastnosti polypeptidu
(enzýmového proteínu), ktorý je kódovaný polynukleotidom
glyA.

6. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že na dosiahnutie zoslabenia sa používa spôsob integračnej mutagenézy pomocou vektora pK18mobglyA' znázorneného na obrázku 1 a uloženého v *E. coli* ako DSM 13170.

7. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že na výrobu L-treonínu sa fermentujú baktérie, v ktorých sa súčasne zvýšene exprimuje alebo amplifikuje jeden alebo viac génov vybraných zo skupiny zahŕňajúcej

7.1 gén hom kódujúci homoserindehydrogenázu,

7.2 gén gap kódujúci glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázu,

7.3 gén pyc kódujúci pyruvátkarboxylázu,

7.4 gén mqo kódujúci malát-chinónoxidoreduktázu,

7.5 gén thrE kódujúci export treonínu.

8. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa na výrobu L-treonínu fermentujú baktérie, v ktorých sa súčasne zoslabuje jeden alebo viac génov vybraných zo skupiny zahŕňajúcej

8.1 gén pck kódujúci fosfoenolpyruvátkarboxykinázu,

8.2 gén poxB kódujúci pyruvátoxidázu.

9. Spôsob podľa jedného alebo viacerých z predchádzajúcich nárokov, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa používajú mikroorganizmy rodu *Corynebacterium glutamicum*.

10. Koryneformné baktérie, v ktorých sa zoslabuje gén glyA.

11. Vektor pK18mobglyA' znázornený na obrázku 1 a uložený v *E. coli* ako DSM 13170.

12. Izolovaný polynukleotid obsahujúci

- (i) nukleotidovú sekvenciu jednotky lacI-tac-5'glyA znázornenú v SEQ ID No. 2 alebo
- (ii) aspoň jednu sekvenciu, ktorá zodpovedá sekvencii (i) v oblasti degenerácie genetického kódu, alebo
- (iii) aspoň jednu sekvenciu, ktorá hybridizuje so sekvenciami komplementárnymi k sekvenciám (i) alebo (ii), a poprípade
- (iv) funkčne neutrálne mutácie so zmyslom v (i).

13. Izolovaný polynukleotid obsahujúci

- (i) nukleotidovú sekvenciu jednotky lacI-tac-glyA znázornenú v SEQ ID No. 3 alebo
- (ii) aspoň jednu sekvenciu, ktorá zodpovedá sekvencii (i) v oblasti degenerácie genetického kódu, alebo
- (iii) aspoň jednu sekvenciu, ktorá hybridizuje so sek-

venciami komplementárnymi k sekvenciám (i) alebo (ii),
a poprípade

(iv) funkčne neutrálne mutácie so zmyslom v (i).

Obrázok

