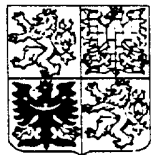


(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **667-95**

(22) Přihlášeno: **23. 09. 93**

(30) Právo přednosti:
28. 09. 92 DE 92/4232468

(40) Zveřejněno: **12. 03. 97**
(Věstník č. 3/97)

(47) Uděleno: **15. 05. 97**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **16. 07. 97**
(Věstník č. 7/97)

(86) PCT číslo: **PCT/EP93/02588**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 94/08031**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 P 13/22

C 12 N 15/01

C 12 N 1/20

// (C 12 N 1/20, C 12 R 1:19,

C 12 R 1:15)

(73) Majitel patentu:

**CONSORTIUM FÜR ELEKTROCHEMISCHE
INDUSTRIE GMBH, München, DE;**

(72) Původce vynálezu:

Wich Günter dr., München, DE;
Leinfelder Walfred dr., München, DE;
Backman Keith dr., Bedford, MA, US;

(74) Zástupce:

Všetečka Miloš dr., Hálkova 2, Praha 2,
12000;

(54) Název vynálezu:

**Způsob výroby mikroorganismů pro
produkci tryptofanu a jejich použití**

(57) Anotace:

Řešení se týká způsobu výroby mikroorganismů, produkujících tryptofan, při kterém se mikroorganismy, které jsou deregulovány v alespoň jednom kroku biosyntézy tryptofanu, opatří serA-alelou, která má sníženou citlivost vůči inhibici serinem, přičemž - mikroorganismy, které jsou deregulovány v alespoň jednom kroku biosyntézy tryptofanu, se podrobí mutagenézi a mutagenem zpracované populace organismů se podrobí selekci na klony se serA-geny, které kódují pro serin necitlivé fosfoglycerátdehydrogenázy, nebo

- ser-alely, které kódují pro serin necitlivé fosfoglycerátdehydrogenázy, se vyrobí technikami genového inženýrství, výhodně technikami místně směřované mutagenéze, a takovéto alely se vnesou do mikroorganismů, které jsou deregulovány v alespoň jednom kroku biosyntézy tryptofanu, tak že se integrované vyskytují buď na autonomně replikovatelném rekombinantním vektoru nebo v chromozomu kmene. Dále se týká použití takto vyrobených mikroorganismů pro fermentativní produkci tryptofanu.

Způsob výroby mikroorganismů pro produkci tryptofanu a jejich použití

Oblast techniky

5

Vynález se týká způsobu výroby mikroorganismů pro produkci tryptofanu a jejich použití pro výrobu tryptofanu.

10

Dosavadní stav techniky

Je známé, že látková přeměna tryptofanu ve všech dosud zkoušených mikroorganismech probíhá přes jednoduchou biosyntézní cestu (Somerville, R. L., Hermann, K. M., 1983, Aminoacids, Biosynthesis and Genetic Regulation, Adelison-Wesley Publishing Company, USA: 301 - 322 a 351 - 378; Aida a kol., 1986, Biotechnology of amino acid production, progress in industrial microbiology Vol. 24, Elsevier Science Publishers, Amsterdam: 188 - 206). Látková přeměna tryptofanu, její spojení s látkovou přeměnou serinu, jakož i geny, kódované pro nejdůležitější enzymy, jsou znázorněné na obr. 1.

Známé způsoby produkce tryptofanu spočívají v tom, že je mutovaný *trpE*-gen, který je kódován pro tryptofan-intenzivní antranilátsyntetázu, exprimován společně s jinými geny *trp*-operonu na vhodném autonomním replikovatelném vektoru. Větším množstvím kopií genu dochází ke zvýšené expresi *trp*-genu a v souladu s tím ke zvýšenému množství jednotlivých enzymů látkové přeměny tryptofanu. Důsledkem toho je nadprodukce tryptofanu.

25

Příklady takovýchto postupů jsou popsány pro řadu organismů, například pro *Escherichia coli* (EP 0 293 207, US 4 371 614), pro *Bacillus* (US 4 588 687) a pro *Corynebakterium* a *Brevibakterium* (EP 0 338 474). Při těchto způsobech dochází k řadě problémů ve vedení procesu. Může docházet k nestabilitě a ke ztrátám vektoru, nebo k prodloužení růstu produkčního kmene.

30

EP-A-0 401 735 (příhlašovatel: Kyowa Hakko Kogyo Co.) popisuje způsob produkce L-tryptofanu za pomoci kmenů *Corynebakterium* nebo *Brevibakterium*, které obsahují rekombinantní plazmidy. Tyto plazmidy nesou genetické informace pro syntézu enzymů DAHP-syntetázy, antranilátsyntetázy, indol-3-glycerol-P-syntetázy, tryptofansyntetázy a fosfoglycerátdehydrogenázy. Používají se antranilsyntetázové alely, rezistentní vůči zpětnému ovlivňování (feedbackrezistentní).

35

Dále je známo zvyšování produkce tryptofanu v kmenech s deregulovanou látkovou přeměnou tryptofanu vnesením více divokých typů genů *serA* nebo *serA*, *B*, *C*. Chemical Abstracts CA 111 (1989) 16 86 88q a CA 11 (1989) 16 86 89r popisují například použití kmenů *Bacillus*, které divoký typ alely *serA*, popřípadě všechny typy divokých genů látkové přeměny serinu (*serA*, *serB* a *serC*) přeexprimují na plazmidy pro produkci tryptofanu.

40

Zvýšení výtěžku tryptofanu snížením odbourávání serinu v buňce je známo z EP-A-0 149 539 (příhlašovatel: Sauffer Chemical Company). Tato patentová přihláška popisuje K12-mutanty *E. coli*, ve kterých je serin, odbourávající enzym serindeamináza (*sda*), rozrušován. Popisuje také použití takových kmenů pro produkci aminokyselin. Příklad VIII popisuje využití takového kmene pro nadprodukci tryptofanu z antranilátu. Výtěžky tryptofanu, zlepšené ve srovnání s kmenem s intaktní serindeaminázou, se v této evropské patentové přihlášce vysvětlují tím, že v mikroorganismech, ve kterých je zásoba předstupňů tryptofanu velmi vysoká, je serin, popřípadě kapacita biosyntézy serinu parciálně limitující pro produkci tryptofanu.

45

50

Podstata vynálezu

Úkolem předloženého vynálezu je dát k dispozici mikroorganismy, které by ve vyšší míře produkovaly tryptofan, tedy vypracovat způsob, který by umožnil výrobu takového mikroorganismu.

Uvedený úkol byl vyřešen pomocí způsobu výroby mikroorganismů, produkujících tryptofan, jehož podstata spočívá v tom, že se mikroorganismy, které jsou deregulovány v alespoň jednom kroku biosyntézy tryptofanu, opatří serA-alelou, která má sníženou citlivost vůči inhibici serinem, přičemž

- mikroorganismy, které jsou deregulovány v alespoň jednom kroku biosyntézy tryptofanu, se podrobí mutagenезi a mutagenem zpracované populace organismů se podrobí selekci na klony se serA-ge-ny, které kódují pro serin necitlivé fosfoglycerátdehydrogenázy, nebo

- ser-alely, které kódují pro serin necitlivé fosfoglycerátdehydrogenázy, se vyrobí technikami genového inženýrství, výhodně technikami místně směřované mutagenезe, a takovéto alely se vnesou do mikroorganismů, které jsou deregulovány v alespoň jednom kroku biosyntézy tryptofanu, tak že se integrovaně vyskytují buď na autonomně replikovatelném rekombinantním vektoru, nebo v chromosomu kmene.

Tímto způsobem vyrobené mikroorganismy se vyznačují tím, že mají deregulovanou látkovou přeměnu tryptofanu a alespoň vůči zpětnému působení rezistentní (feedbackrezistent) serA-alelou deregulovanou látkovou přeměnu serinu.

Ve smyslu předloženého vynálezu se pod pojmem „vůči zpětnému působení rezistentní serA-alely“ rozumí mutanty serA-ge-ny, které pro fosfoglycerátdehydrogenázu kódují ve srovnání s odpovídajícím divokým typem fosfoglycerátdehydrogenázy odpovídajícího mikroorganismu se sníženou senzitivitou serinu.

Kombinací podle předloženého vynálezu alespoň jedné vůči zpětnému působení rezistentní serA-alely s mikroorganismem s deregulovanou látkovou přeměnou tryptofanu se zvýší neobvykle a neočekávaně o až 2,6 násobek výtěžku ve srovnání s výtěžky, kterých se může dosáhnout se stejným mikroorganismem bez vůči zpětnému působení rezistentní serA-alely při jinak stejných kultivačních podmínkách.

To, že kmeny podle předloženého vynálezu produkují ve zvýšené míře tryptofan, je neočekávané a překvapivé, neboť vůči zpětnému působení rezistentní serA-alely vykazují efekt pouze při vysoké intercelulární hladině serinu (Tosa T., Pizer L. J., 1971, Journal of Bacteriology Vol. 106: 972 - 982; Winicov J., Pizer L. J., 1974, Journal of Biological Chemistry Vol. 249: 1348 - 1355). Podle stavu techniky (například EP-A-0 149 539) mají mikroorganismy s deregulovanou látkovou přeměnou tryptofanu však nízkou hladinu serinu. Proto není možno očekávat při vnesení vůči zpětnému působení rezistentní serA-alely podle předloženého vynálezu do mikroorganismů s deregulovanou látkovou přeměnou tryptofanu zvýšení produkce tryptofanu.

Vzhledem k tomu, že u všech známých mikroorganismů probíhá přeměna tryptofanu mechanismem, znázorněným na obr. 1 a techniky, použité pro výrobu kmenů podle předloženého vynálezu jsou v principu známé a použitelné na všechny mikroorganismy, jsou kmeny podle předloženého vynálezu vyrobitelné z libovolných mikroorganismů.

Výborně vhodné jsou pro výrobu kmenů podle předloženého vynálezu bakterie. Obzvláště výborně vhodné jsou gramnegativní bakterie, především E. coli.

Kmeny se tedy podle předloženého vynálezu mohou získat tak, že se v libovolném tryptofan–prototrofním výchozím kmenu zcela nebo částečně zruší látková přeměna tryptofanu a do tohoto kmene se zavede vůči zpětnému působení rezistentní serA–alela. Mohou se rovněž získat tak, že se u tryptofan–auxotrofních výchozích kmenů obnoví schopnost syntetizovat tryptofan, přičemž
 5 je rekonstruovaná látková přeměna tryptofanu deregulovaná, a do takovýchto kmenů se vnese vůči zpětnému působení rezistentní serA–alela.

Deregulace látkové přeměny tryptofanu v mikroorganismech se může provádět pomocí řady různých přístupů, které jsou známy ze stavu techniky.

10 Jedna možnost deregulace látkové přeměny tryptofanu spočívá v tom, že se změní enzym antranilátsyntetáza. Tento enzym katalyzuje u všech mikroorganismů první krok tryptofan–specifické biosyntézní cesty. Tryptofan je ve své aktivitě potlačován a tím je regulován, v závislosti na množství tryptofanu, proud metabolitů tryptofanovou biosyntézní cestou. Enzym
 15 je kódován pomocí genu trpE.

Modifikované trpE–geny, které kódují antranilátsyntetázy se sníženou selektivitou vůči tryptofanu ve srovnání s odpovídajícím divokým typem antranilátsyntetázy, označované v následujícím jako vůči zpětnému účinku rezistentní (feedbackrezistent) trpE–alely, se mohou
 20 získat mutagenézí a následující selekcí tryptofan–prototrofního výchozího kmene. K tomu se odpovídající kmen podrobí mutaci indukujícímu zpracování (Miller J. H., 1972 Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, USA: 113 - 185).

Zpracováváný kmen se nanese na živné médium, které obsahuje alespoň jeden antagonist tryptofanu v množství, které postačuje k tomu, aby byl růst kmene potlačen. Jako příklady
 25 vhodných antagonistů tryptofanu je možno uvést 4–methyltryptofan, 5–methyltryptofan, 6–methyltryptofan, halogenové tryptofany, tryptazan, indol a kyselinu indolakrylovou.

Rezistentní klony se zkoušejí na tryptofan–senzitivitu své antranilátsyntetázy. Pro stanovení tryptofansenzitivity antranilátsyntetázy se může použít každá metoda, která dovoluje změřit aktivitu tohoto enzymu za přítomnosti tryptofanu. Například se může nechat reagovat za enzymatické katalýzy chorismat ve vhodném pufrovacím systému se svým reakčním partnerem glutaminem (Bauerle R. a kol., 1987, Methods in Enzymology Vol. 142: 366 - 386). Testovaná
 30 vsázka se kineticky alikvotně odebere a pomocí HPLC–analýzy se stanovuje množství antranilátu jako reakčního produktu, vzniklého za jednotku času. Množství antranilátu, vytvořeného za časovou jednotku, je přímo mírou aktivity antranilátsyntetázy. Test se provádí za přítomnosti a za nepřítomnosti tryptofanu, aby se stanovila senzitivita testované antranilátsyntetázy.

40 Je ale také možné připravit tryptofan–insenzitivní trpE–alely přímou genově technickou manipulací (Bauerle R. a kol., 1987, Methods in Enzymology Vol. 142: 366 - 386). Je popsána řada mutací v aminokyselinové sekvenci antranilátsyntetázy různých organismů, které vedou ke snížení senzitivity enzymu vůči tryptofanu (například pro Salmonellu: Caliguiri M.G., Bauerle R., 1991, J. of Biol. Chem. Vol. 266: 8328 - 8335; pro Brevibacterium a Corynebacterium: Matsui K. a kol., 1987, J. bact. Vol. 169: 5330 - 5332).

Jsou známy metody, které umožňují zavést mutaci v DNA–fragmentu na specifickém místě. Takovéto metody jsou mimo jiné popsány v následujících publikacích:

50 Sakar G., Sommerauer S. S., 1990 Bio Techniques 8: 404 - 407, Polymerase chain reaction abhängige site directed mutagenese;

Aushubel F. M. a kol., 1987, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, Phage M13 abhängige Method;

Smith M., 1985, Ann. Rev. Genet. 19: 423 - 462, jiné metody.

5 DNA-fragment, který zahrnuje divoký typ *trpE*-genu, se pomocí již popsanych standardních technik pro výrobu rekombinantní DNA rekombinuje na vektor. Použitím výše uvedených metod pro „site-directed“ mutagenezi se jeden nebo několik nukleotidů DNA-sekvence změní tak, že nyní genem kódovaná aminokyselinová sekvence odpovídá aminokyselinové sekvenci tryptofan-insenzitivní antranilsyntetáze.

10 Pomocí popsanych technik se dá do libovolného *trpE*-genu zavést jedna nebo více mutací, které způsobují, že kódovaná antranilátsyntetáza má aminokyselinovou sekvenci, vedoucí k tryptofan-insenzitivitě.

15 Dodatečně jsou v kmenu podle předloženého vynálezu žádoucí, ale ne nezbytně nutné, následující vlastnosti:

defektní tryptofanrepresorový protein, defektní attenuační kontrola exprese *trp*-operonu a defektní tryptofanáza. Tyto vlastnosti se dají v kmenu podle předloženého vynálezu nejjednodušeji získat volbou výchozího kmene, který může již získat jednu nebo více těchto odpovídajících vlastností. Příprava nebo volba může probíhat kombinací v následujícím uvedených selekčních metod.

25 Tryptofanrepresorový protein je nadřazený regulátorový protein biosyntézy tryptofanu. Společně s tryptofanem jako aporepresorem reprimuje tento protein expresi *trp*-operon-genu. Protein je kódován genem *trpR*. Tryptofanrepresorové mutanty se mohou selektovat například pod mutantami, které jsou rezistentní vůči antagonistům tryptofanu, jako je například 5-methyltryptofan. Příklady jsou popsány v J. Mol. 44, 1969, 185 - 193 nebo Genetics 52, 1965, 1303 - 1316.

30 Vedle kontroly pomocí *trpR*-kódovaného proteinu podléhá *trp*-operon dodatečně attenuační kontrole. Zodpovědný za tuto regulaci je DNA-region před prvním genem *trp*-operonu. Mutace nebo delece v této oblasti mohou vést k deregulaci. Takovéto mutanty mohou být selektovány pod mutanty, které jsou rezistentní vůči antagonistům tryptofanu, jako je například 5-methyltryptofan. Za druhé mohou být dosaženy takovéto mutace, obzvláště, ale delece tak, že se způsobem „site-directed-mutagenese“ indukuje tato změna místně specificky v attenuační oblasti DNA.

40 Pomocí již popsanych technik místně specifické mutagenese je možné rekombinovat inaktivovanou attenuační oblast do chromozomu kmene podle předloženého vynálezu na místo přírodní attenuační oblasti.

45 Enzym tryptofanáza (*tnaA*) katalyzuje odbourávání tryptofanu na indol, pyruvát a amoniak. Je žádoucí, aby tento enzym byl v tryptofan-produkčních kmenech inaktivní. Kmeny, ve kterých je tento enzym defektní, se mohou získat tak, že se organismy podrobí mutagennímu zpracování a pod mutantami se rozumí takové, které již nejsou schopné využívat tryptofan jako zdroje uhlíku a dusíku. Detailní příklad popisuje J. Bact. 85, 1965, 680 - 685. Alternativně je rovněž možné pomocí výše uvedených technik zavést místně specifické delece do *tnaA*-genu, což vede potom k inaktivaci.

50 Řada dodatečných mutací výchozího kmene je vhodná k tomu, aby se dosáhlo dalšího zvýšení produkce tryptofanu. Je výhodné, když je vedle tryptofanové biosyntézní cesty dodatečně všeobecná biosyntézní cesta aromatických aminokyselin (cesta shikimi kyseliny) regulačně insenzitivní. Proto jsou kmeny, které mají regulačně insenzitivní syntetázu kyseliny dehydroarabinoheptulosonové a jejich tyrosinrepresorový protein (*tyrR*) je působením mutace

nebo delece inaktivován, vhodné jako výchozí kmeny pro přípravu kmenů podle předloženého vynálezu. Rovněž tak jsou výhodné kmeny, u nichž je porušena látková přeměna fenylalaninu a tyrosinu. Tím se zajistí výsledný přechod chorismatu na tryptofan. Takovéto kmeny mají například mutace nebo delece v genech *pheA* a/nebo *tyrA*.

5

Je známá řada kmenů, které jsou v jednom nebo více krocích biosyntézy tryptofanu deregulované a nadprodukují tryptofan. Jako příklady je možno uvést *Bacillus subtilis* FermBP-4 a FermP1483 (DE 3 123 001), *Brevibacterium flavum* ATCC 21427 (US 3 849 251), *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21842 - 21851 (US 3 594 297 a US 3 849 251),
10 *Micrococcus luteus* ATCC 21102 (US 3 385 762), *Escherichia coli* ATCC 31743 (CA 1182409). Tyto kmeny jsou rovněž vhodné jako výchozí kmeny pro přípravu kmenů podle předloženého vynálezu. Tím se ukazuje, že kmeny pro produkci tryptofanu podle předloženého vynálezu je možno získat z nejrůznějších skupin organismů.

15

Vedle kmenů s deregulovanou látkovou výměnou tryptofanu je pro výrobu kmenů podle předloženého vynálezu potřebný alespoň jeden gen, který kóduje fosfoglycerátdehydrogenázu se sníženou serin-senzitivitou ve srovnání s odpovídající fosfoglycerátdehydrogenázou divokého typu.

20

Fosfoglycerátdehydrogenáza (PGD) se kóduje pomocí genu *serA*. Sekvence divokého typu *serA*-genu je známá (Tobey K. L., Grant G. A., 1986, J. Bact. Vol. 261, č. 26: 1279 - 1283). Nadexprese produktu divokého typu *serA*-genu přes plazmid-vektor je rovněž známá (Schuller a kol., 1989, J. Biol. Chem. Vol. 264: 2645 - 2648).

25

Výroba vůči zpětnému účinku rezistentních *serA*-alel pomocí klasického genetického postupu byla popsána Tosou T. a Pizerem L. T., 1971, J. Bact. Vol. 106, č. 3: 972 - 982. Selekcce se přitom provádí přes rezistenci mutantů vůči serinovému analogu serinhydroxamátu. Mutace nejsou v tomto literárním odkaze blíže charakterizované; vliv mutace na látkovou přeměnu nebyl zkoumán.

30

Vůči zpětnému účinku rezistentní *serA*-alely jsou také například získatelné tak, že se mikroorganismus podrobí mutagenезi. Jako mutagen přichází v úvahu ultrafialové záření a obvyklé chemické mutageny, jako je například ethylmethansulfonát nebo N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin. Dávkování a doba expozice zvoleného mutagenu se stanovuje pomocí dosavadních postupů (Miller J. H., 1972, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, USA: 113 - 143).
35

Mutagenem zpracované populace organismů se podrobí selekci na klony se *serA*-geny, které se kódují pro serin-insenzitivní fosfoglycerátdehydrogenázy. Například se inkubuje mutagenem
40 zpracovaná populace na pevném růstovém médiu, které obsahuje v dostatečném množství serinhydroxamát, aby se potlačil růst nerezistentních bakterií.

Rezistentní klony se testují na serin-senzitivitu svojí fosfoglycerátdehydrogenázou. Příkladné provedení tohoto postupu je popsáno Thosou a Pfizerem, 1971, J. Bact. 100, 3: 972 - 982.

45

Alely, které kódují serin-insenzitivní fosfoglycerátdehydrogenázu, se mohou také připravit pomocí technik „genetic engineering“.

50

Region fosfoglycerátdehydrogenázy, který umožňuje serin-regulaci, leží v C-terminální oblasti proteinu. Proto se tedy inserce, substituce nebo delece jednotlivých nebo více aminokyselin zavádí výhodně v C-terminálních 25 % PGD-proteinu, obzvláště výhodně v 50 C-terminálních aminokyselinách PGD-proteinu. Toto vede ke snížené senzitivitě PGD vůči serinu.

- Aluely, které kódují takovéto PGD, se získají tak, že se změní 3'-oblast serA-genu, který kóduje uvedené C-terminální oblasti PGD. K tomu se nemutovaný serA-gen rekombinuje za využití technik pro výrobu rekombinantní DNA, které jsou pro odborníky známé, jako je restrikce, ligace a transformace (Maniatis T., Fritsch E. F. a Sambrook J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 1982, Cold Spring Harbor Laboratory), na klonovací vektor.

Specifické změny ve 3'-oblasti strukturního genu se mohou například dosáhnout pomocí techniky „site-directed-Mutagenese“.

- Příklady serin-insenzitivních fosfoglycerátdehydrogenáz, které jsou vhodné pro expresi v mikroorganismech s deregulovanou látkovou přeměnou tryptofanu, jsou uvedeny znázorněním svých C-terminálních aminokyselinových sekvencí v následující tabulce 1. Až na znázorněnou C-terminální oblast se proteinové sekvence enzymů neliší od sekvence divokého typu.
- Aby se mohly genové produkty serA-alely vyzkoušet na PGD-aktivitu a serin-senzitivitu, využije se k tomu následující test:

- PGD-aktivita byla stanovena důkazem obousměrné reakce enzymu podle metody Mc Kitricka J. C. a Lewise J. P., 1980, J. Bact. 141: 235 - 245. Aktivita enzymu se přitom měřila bez serinu a s různými koncentracemi serinu. Uvedený test je vhodný pro stanovení serin-senzitivity každé fosfoglycerátdehydrogenázy. Může se ale použít každá další metoda měření PGD-aktivity.

- Jako míra serin-senzitivity enzymu slouží hodnota K_i , což je koncentrace serinu, která inhibuje aktivitu enzymu z 50 %. K_i hodnoty a C-terminální sekvence aminokyselin více vůči zpětnému působení rezistentních serA-alel, jakož i divoký typ serA-genu (serAWT), jsou uvedené v následující tabulce 1.

Tabulka 1

30

	C-terminální sekvence aminokyselin mutovaných serA-alel	K_i /mM
ser AWT	AEQG V _____ NIA AQYL QTSA QMGY VVID IEAD EDVA EKAL QAMK AIPG TIRA RLLY	0,02 SEQ ID NO: 1
serA 5	AEQG V _____ NIA AQYL QTSA QMGY VVID IEAD EDVA EKAL QAMK AIPG TIRA RLL_	0,2 SEQ ID NO: 2
serA 1508	AEQG VCSR ANIA AQYL QTSA QMGY VVID IEAD EDVA EKAL QAMK AIPG TIRA RLLY	3,8 SEQ ID NO: 3
serA 11	AEQG VCSR ANIA AQYL QTSA QMGY VVID IEAD EDVA EKAL QAMK AIPG TIRA RLL_	50 SEQ ID NO: 4
serA 1455	AEQG V _____ NIA AQYL QTSA QMGY VVID IEAD EDVA EKAL QAMK AIPG TIR_ _____	100 SEQ ID NO: 5

Pro výrobu kmenů podle předloženého vynálezu jsou výborně vhodné překvapivě serA-alely s hodnotami K_i v rozmezí 100 a 50 mM serinu.

35

Pro expresi PGD-proteinů ve kmenu podle předloženého vynálezu se může použít každý rekombinantní vektor, který vede k expresi serin-insenzitivních serA-alel. Rekombinantní vektor, vhodný pro výrobu kmenů podle předloženého vynálezu, zahrnuje alespoň jeden serA-gen, který kóduje PGD, který má vůči divokému typu sníženou senzitivitu vůči serinu, a jeden podíl vektoru, který je ve kmenu hostitele autonomně replikovatelný.

40

Příklady vektorů, které jsou autonomně replikovatelné v *Escherichia coli*, jsou uvedené Pouwelem P. H., Engerem-Valkem a Brammarem W. J., 1985, *Cloning Vectors*, Elsevier, Amsterdam.

5

Takovéto vektory jsou mimo jiné:

- Plazmidy vysokým počtem kopií, jako je například pBR322 nebo pUC12;
- 10 - plazmidy se středním počtem kopií, jako je například pACYC184, 177;
- plazmidy s nízkým počtem kopií, jako je například pSC101;
- fágové vektory, jako je například M13, gama-vektory.

15

Srovnatelné vektory jsou popsány pro velký počet bakterií (například EP 0 401 735 pro *Corynebakterium* a *Brevibakterium* nebo CA 111 (1989) 168688q).

20

Obzvláště výhodné jsou vektory se středním až nízkým počtem kopií, především jsou výhodné vektory s p15A-replikonem, jako je například pACYC184 (ATCC 37033) nebo pACYC177 (ATCC 37031).

V literatuře je dále popsán velký počet vektorů pro jiné bakterie (Pouwels a kol., 1985, *Cloning Vectors*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam).

25

Vhodné rekombinantní vektory se mohou vyrobit pomocí standardních technik pro výrobu rekombinantních DNA. Tyto techniky jsou vyčerpávajícím způsobem uvedený například v publikaci Maniatis T., Fritsch E. F. a Sambrook J., 1982, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, USA nebo Ausubel F. M. a kol., 1987, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, USA.

30

Výroba rekombinantních vektorů je například možná tak, že se DNA dárcovského organismu, který má serA–alelu v chromozomu nebo na rekombinantním vektoru, který kóduje vůči serinu insenzitivní fosfoglycerátdehydrogenázu, fragmentuje pomocí restrikčních enzymů. Fragmentovaná DNA se liguje pomocí konvenčních metod, například použitím enzymu T4–DNA–ligázy, na rovněž pomocí restrikčních enzymů linearizovanou molekulu vektoru. Ligační směs se využije k tomu, aby se hostitelské kmeny s deregulovanou látkovou přeměnou tryptofanu transformovaly pomocí známých způsobů, jako je kalciumchloridový šok nebo elektroporace. Vektory, které obsahují požadované serA– alely, se mohou v hostitelských kmenech získat například pomocí výše uvedených způsobů, jako je selekce na rezistenci vůči antibiotikům nebo komplementace serA–mutací.

35

40

V další formě provedení kmenů podle předloženého vynálezu jsou serA–alely integrovány jako jednotlivé kopie do chromozomu. Tohoto se může jednat dosáhnout tím, že se provede výše popsaná mutagenezní a selekční strategie přímo s tryptofan–deregulovaným výchozím kmenem. Za druhé je také možné serA–alely, které se nacházejí na rekombinantních vektorech, integrovat do chromozomu produkčního kmene. Řada metod k takovéto integraci je známá. Popisy takovýchto technik se nacházejí v následujících publikacích:

45

Integrace, zprostředkovaná fágem lambda: Balakrishnan a Backmann, 1988, *Gene* 67: 97 - 103; Simons R. W. a kol., 1987, *Gene* 53: 85 - 89;

50

Genreplacement, závislý na recD: Shervell a kol., 1987, *J. Bact.* 141: 235 - 245;

Další metody: Silhavy a kol., 1988, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory.

- 5 Při fermentaci kmenů podle předloženého vynálezu se ukázalo zcela překvapivě, že kmeny, obsahující vůči zpětnému účinku rezistentní serA–alelu s hodnotou K_i pro serin v rozmezí 100 μ M až 50 mM a s deregulovanou látkovou výměnou tryptofanu, a obsahující trpE–alelu s hodnotou K_i pro tryptofan v rozmezí 0,1 mM až 20 mM, poskytují nejvyšší výtěžky tryptofanu.

10 Příklady provedení vynálezu

Následující příklady provedení slouží k dalšímu objasnění předloženého vynálezu.

15 Příklad 1

Screening na vůči zpětnému působení rezistentní alelu a integrace této alely do chromozomu

- 20 Pro hledání vůči zpětnému působení rezistentních trpE–alel se používá analog tryptofanu 5–methyltryptofan. Jako mutagenní činidlo slouží N–methyl–N′–nitro–N–nitrosoguanidin (NG). Použitý výchozí kmen je Escherichia coli K12 YMC9 ATCC 33927. Pracovní postup při mutagenезi se řídí podle údajů Millera (Miller J. H., 1972, Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.: 125 - 129).

- 25 Asi 2×10^9 buněk YMC9 z exponenciální růstové fáze v LB pěstované kultury se inkubuje ve 4 ml 0,1 M Na–citrátového pufru při pH 5,5 po dobu 30 minut při teplotě 37 °C s 50 μ g/ml NG. Po dvojnásobném promytí 0,1 M fosfátovým pufrům o pH 7,0 se 0,1 ml buněk kultivuje přes noc při teplotě 37 °C za třepání LB. Potom se 0,1 ml buněk z různých zředění (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-9} v 0,9 % NaCl) nanese na plotny s minimálním médiem se 100 μ g/ml 5–methyltryptofanu. Vedle
30 5–methyltryptofanu obsahuje minimální médium 5 g/l glukózy, 5 mg/l vitaminu B1, 3 g/l dihydrogenfosforečnanu draselného, 12 g/l hydrogenfosforečnanu draselného, 0,3 g/l heptahydrátu síranu hořečnatého, 0,1 g/l chloridu sodného, 5 g/l síranu amonného, 17,7 mg/l dihydrátu chloridu vápenatého, 2 mg/l heptahydrátu síranu železnatého, 1 g/l citrátu trojsodného a 15 g/l agaru. Po 24 až 48 hodinách při teplotě 37 °C se 5–methyltryptofan–rezistentní klony
35 oddělí na výše uvedené plotny.

- Pro charakterizaci získaných mutantů se stanovuje K_i –hodnota trpE–genového produktu pro tryptofan (Bauerle R. a kol., 1987, Methods in Enzymology Vol. 142: 366 - 386). Mutanty by se
40 mohly přitom rozdělit do dvou tříd. Mutanty třídy 1 mají vůči zpětnému působení rezistentní antranilátsyntetázy, mutanty třídy 2 mají enzymy se zvýšenou aktivitou antranilátsyntetázy při nezměněné hodnotě K_i .

- Pro charakterizaci na molekulární rovině se relevantní oblasti DNA různých mutantů klonují a sekvencují. K tomuto účelu se izoluje odpovídající chromozomální DNA a ve vsázce se
45 rozštěpí pomocí restrikčních enzymů NheI a ClaI. Fragmenty jedné velikosti asi 5 kb se izolují a ligují se pomocí 4158 bp velikého NheI/ClaI–fragmentu pBR322. Ligační vsázka se transformuje do trpE–kmene E. coli KB 862 (DSM 7196). Selektuje se na klony, které mohou růst na minimálním médiu bez tryptofanu. Komplementující plazmidy obsahují všechny 5 kb NheI/ClaI–fragment. Vedle genů trpE a trpD obsahuje tento 5 kb NheI/ClaI–fragment také DNA–oblasti po
50 směru od trpE (asi 0,8 kb) a po směru od trpD (asi 1 kb). V následující tabulce 2 jsou uvedeny rozdíly sekvence aminokyselin a K_i –hodnoty 4 mutantů třídy 1. V neznázorněných oblastech souhlasí sekvence mutantů se sekvencí divokého typu.

Tabulka 2

	Sekvence aminokyselin mutovaných trpE-alel	K _i /mM
trpE WT	NPTA LFIIQ LCGD RPAT LLLE SADI DSKD DLKS	0,01 SEQ ID NO: 6
trpE 0	E	0,1 SEQ ID NO: 7
trpE 5	S	3,0 SEQ ID NO: 8
trpE 6	F E	>15 SEQ ID NO: 9
trpE 8	S E	15 SEQ ID NO: 10

Sekvenční analýza mutantů třídy 2 ukazuje, že mutace existují buď v oblasti operátoru trp-promotoru, nebo v oblasti DNA, která kóduje trp-řídící peptid. Mutace, označené jako deltatrpl1, popřípadě deltatrpl2, mají 136 bp, popřípadě 110 bp velikou delecí v oblasti DNA, kódované pro řídící peptid. Pro deltatrpl1 mutaci zahrnuje delecce oblast pozice nukleotidů 33 až do pozice 168, u deltatrpl2 mutace oblast od pozice nukleotidů 11 až do 120, v sekvenci, uložené v EMBL-databázi pod číslem AC VOO372.

Aby se dosáhlo silnější exprese vůči zpětnému působení rezistentních trpE-alel, kombinují se obě třídy mutace. K tomu se použije mutace deltatrpl1 třídy 2. Na obr. 2 je ukázána řada deltatrpl1 mutací (třída 2) a mutace trpEO, trpE5, trpE6 a trpE8 (třída 1).

Z plazmidu deltatrpl (obr. 2) se izoluje 1,6 kb NruI-fragment, který nese deltatrpl1-mutaci a vymění se za odpovídající NruI-fragment divokého typu plazmidů pEO, pE5-pE6, popřípadě pE8 (obr. 2). Získané plazmidy jsou pojmenovány jako pIEO, pIE5, pIE6, popřípadě pIE8 a použijí se pro chromozomální integraci homologních rekombinací. K tomu se z uvedených plazmidů izolují odpovídající, asi 5 kb velké chromozomální NheI (ClaI-fragmenty, jak je uvedeno v příkladě 2 z low melting agarózy, a v lineární formě se transformují do recD-kmene PD106 [deltatrplD102].

Jako transformační metoda se použije CaCl₂-metoda podle Cohena a kol., 1972, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2110 - 2114. K en PD106 je uložen podle Budapešťské smlouvy od 28. 07. 1992 v Německé sbírce mikroorganismů (DSM) pod číslem 7195 (DSM 7195). Selektují se klony, které mohou růst na minimálním médiu bez tryptofanu a které jsou ampicilin-senzitivní, to znamená prosté plazmidu.

P1-trasdukcí (Miller J. H., 1972, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor, N. Y.: 201 - 205) se trpE-alely, které kódují různě vůči zpětnému působení rezistentní trpE-enzymy a jsou odpovídajícím způsobem kombinované s deltatrpl1-mutací, přecházejí z odpovídajících kmenů do KB862. Kmen KB862 je uložen podle Budapešťské smlouvy od 28. 07. 1992 v Německé sbírce mikroorganismů (DSM) pod číslem 7196 (DSM 7196). Selektují se klony, které mohou růst na minimálním médiu bez tryptofanu. Získané kmeny byly označeny jako PD103 (trpEO), KB862 (trpE5), SV164 (trpE8) a SV163 (trpE6).

Příklad 2

Výroba serA-genů, které jsou kódovány pro serin-intenzivní fosfoglycerátdehydrogenázy

Divoký typ *serA*-genů z *Escherichia coli* kmene *E. coli* B (ATCC 23226) se klonuje na plazmidový vektor pUC18.

- 5 Aby se získala chromozomální DNA tohoto kmene, nechá se na něj přes noc působit při teplotě 37 °C Luria–Broth. Bakteriální buňky se získají centrifugací (4000 g). Lyze buněk a čištění DNA se provádí metodou, popsanou Ausubelou a kol., 1987, 2.4.1 - 2.4.2, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates. Získané množství DNA se stanovuje spektrofotometricky při vlnové délce 260 nm. Výtěžek je okolo 600 mg/100 ml.
- 10 100 µg chromozomální DNA se štěpí pomocí restrikčního enzymu SphI (Boehringer Mannheim GmbH) za podmínek, udaných výrobcem. Asi 3 µg směsi fragmentů se liguje pomocí 0,2 µg rovněž SphI–štěpeného autonomního replikovatelného plazmidového vektoru pUC18 (firmy
- 15 100 µg chromozomální DNA se štěpí pomocí restrikčního enzymu SphI (firmy Boehringer Mannheim GmbH) pomocí enzymu T₄–ligáza (firmy Boehringer Mannheim GmbH) za podmínek, udávaných výrobcem. Ligační směs se použije k tomu, aby se *serA*–mutanty PC1523 (CGSC#: 5411;) (CGSC: *E. coli* Genetic Stock Center, Department of Biology 255 OML, Yale University, Postbox 6666, New Haven, CT, USA) transformovaly. Jako transformační metoda se použije CaCl₂–metoda podle Cohena a kol., 1972, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2110 - 2114. Transformované bakterie se nanesou na plotny s minimálním médiem bez serinu. Klony, které bez serinu rostou, obsahují *serA*–gen z *E. coli* na 3,5 kb velikém SphI–fragmentu. Sekvence divokého typu *serA*–genů je uvedena na obr. 3 (SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14). Rekombinantní vektor se *serA*–genem je označen jako pGC3 (obr. 4).

- 25 *SerA*–alela *serA5* se vyrobí tak, že se plazmid pGC3 rozštěpí pomocí restrikčních enzymů Sall a KpnI (firmy Boehringer Mannheim GmbH) podle údajů výrobce. Získané fragmenty se rozdělí podle agarozové gelové elektroforézy. Fragment Sall–KpnI o velikosti 2,0 kb, který obsahuje úplný *serA*–gen až na 8 C–terminální kodon, se na gelu přečistí. K tomu se provádí elektroforéza na „low–melting–agaróze“ (firmy Boehringer Mannheim GmbH) tak, aby se mohla DNA pomocí jednoduchého roztavení agarózy získat zpět. 0,2 µg tohoto fragmentu se liguje ekvimolárním množstvím pUC18, štěpeného pomocí HindIII/Sall, a synteticky vyrobeného,
- 30 dvoušroubovicového oligonukleotidu pomocí T₄–ligázy (firmy Boehringer Mannheim GmbH) podle údajů výrobce. Sekvence nukleotidů tohoto oligonukleotidu je následující:

```

      5'                               3'
      C ATT CGC GCC CGT CTG CTG TAA TA
35  CTAGG TAA GCG CGG GCA GAC GAC ATT ATT CGA  SEQ ID NO: 11
      3'                               5'

```

- 40 Tento oligonukleotid doplňuje 7 z 8 posledních C–terminálních kodonů *serA*–genů. Namísto osmého kodonu se zavádí stoptripleť TAA. Fosfoglycerátdehydrogenáza, kódovaná tímto *serA*–genem, je tím zkrácena o jednu C–terminální aminokyselinu. Aminokyselinová sekvence zmnožené PGD je ukázána v tabulce 1 (*serA5*). Rekombinantní plazmid se označuje jako pGH5 (obr. 5). Pomocí ligační vsázky se transformuje *serA*–mutanta PC1523.

- 45 *SerA*–alela *serA1508* se vyrobí následujícím způsobem. Plazmid pGC3 se štěpí pomocí SphI/Sall (firmy Boehringer Mannheim GmbH) podle údajů výrobce. 3 kb–fragment, který nese úplný *serA*–gen, se čistí pomocí gelové elektroforézy a liguje se pomocí vektoru pUC18, štěpeného pomocí SphI/Sall. Rezultující plazmid je označen jako pKB1321 (obr. 6).

- 50 Plazmid pKB13221 se inkubuje s restrikční endonukleázou HindII (firmy Boehringer Mannheim) za podmínek, které dovolují pouze parciální štěpení (0,05 U enzymu pro 1 µg DNA pro 10 minut, obvyklé reakční podmínky podle údaje výrobce). Tím vznikne mimo jiné frakce fragmentů, které jsou štěpeny na pozici 1793 *serA*–genů HindII. Na tomto místě se ligací zavede DNA–linker s XbaI–štěpným místem. Sekvence DNA–linkeru je následující:

```

5'          3'
TGC TCT AGA GCA
ACG AGA TCT CGT
3'          5'

```

SEQ ID NO: 12

5

Inzerce vede k polyfosfátodehydrogenáze, která na tomto místě nese čtyři přidavné aminokyseliny. Jejich sekvence je znázorněna v tabulce 1. Plazmid s touto inzercí se označuje jako pKB 1508 (obr. 7). Je transformován do serA-mutanty PC1523.

10

SerA-alela serA11 se vyrobí tak, že se štěpí plazmid pGH5 pomocí Sall a KpnI (firmy Boehringer Mannheim GmbH) podle údajů výrobce a 2,8 kb veliký fragment se ze směsi fragmentů oddělí pomocí gelové elektroforézy z „low-melting“-agarózy. Tento fragment obsahuje podíl vektoru z pUC18 a C-terminální oblast serA5. Plazmid pKB 1508 se rovněž štěpí pomocí Sall/KpnI. 2,0 kb veliký fragment DNA se eluuje z „low-melting“-agarózového gelu. Tento fragment obsahuje serA-alelu serA1508 s inzertní mutací, avšak chybí 8 C-terminální kodony. Oba fragmenty se spolu ligují a tím se transformuje serA-mutanta PC1523. Výsledný rekombinantní plazmid se označuje jako pGH11 (obr. 8). Kódovaná fosfoglycerátdehydrogenáza spojuje inzertní mutaci serA1508 s deleční mutací serA5. Region s mutacemi v kódované sekvenci aminokyselin je znázorněn v tabulce 1.

20

Pro expresi mutovaných serA-alel v produkčních kmenech se tyto překlenují ve vektoru pACYC 184 (ATCC 37033), vektoru se středním počtem kopií. K tomu se plazmid pGH5 a plazmid pGH11 štěpí pomocí Sall/HinIII a izolují se vždy asi 2 kb velké fragmenty DNA, obsahující serA-alely serA5 a serA11, z „low-melting“-agarózového gelu. Fragmenty se v oddělených vsázkách zpracují pomocí Klenow-fragmentu DNA-polymerázy I z E. coli (firmy Boehringer Mannheim) podle předpisu výrobce, aby se 5'-převíslé štěpené konce restrikčního enzymu převedly na hladké konce. K tomu se 1 µg odpovídajícího fragmentu ve 20 µl reakční vsázce smísí s 5 U Klenow-enzymu, 0,5 mM dATP, dGTP, dTTP a dCTP a s výrobcem doporučeným pufrem a směs se inkubuje po dobu 15 minut při teplotě 30 °C.

30

Fragmenty DNA s hladkým koncem se ligují s vektorem pACYC184, štěpeným pomocí PvuII. Ligační vsázka se využije k tomu, aby se transformovaly serA-mutanty. Komplementované plazmidy byly nazvány pGH5/II, popřípadě pGH11/II (obr. 9, obr. 10). Plazmid pKB1508 se štěpí pomocí Sall/SphI. Fragment velikosti 3,0 kb, který obsahuje serA-alelu serA1508, se čistí pomocí gelové elektroforézy. Tento fragment se výše popsáním způsobem převede na fragment s hladkým koncem, liguje se pACYC184, štěpeným pomocí PvuII, a ligační vsázka se transformuje do E. coli PC1523. Komplementující plazmid byl nazván pKB1508/II (obr. 11).

35

40

Plazmidy pGH5/II (serA5), pGH11/II (serA11) a pKB1508/II se využijí k tomu, aby se transformovaly kmeny PD103 (trpE0), KB862 (trpE5), SV164 (trpE8) a SV163 (trpE6).

Příklad 3

45

Konstrukce chromozomálně kódované, vůči zpětnému působení rezistentní serA5-alely za pomoci rekombinantního gama-profágu

50

Pro integraci do chromozomální lambda „attachment site“ (att lambda) se serA5-alela klonuje do plazmidu pRS551 (Simons a kol., 1987, Gene 53: 85 - 96). K tomu se izoluje asi 2 kb veliký serA5-nesoucí HindIII/Sall-fragment z plazmidu pGH5. 5'-převíslé konce se zaplní pomocí Klenow-fragmentů DNA-polymerázy I (firmy Boehringer Mannheim GmbH) podle předpisu výrobce a za pomoci EcoRI-linkerů (Maniatis a kol., 1982, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.: 396 - 397) se 2 kb

fragment liguje do pomoci EcoRI štěpeného vektoru pRS551. Rekombinantní plazmid se označí jako pRS55.

5 Vyrobením plotnového lyzátu $recA^+$ kmenu, nesoucího pRS5 (například YMC9 ATCC 33927), pomocí lambdaRS45-fága se vyrobí in vivo homologní rekombinací heterogenní lambda-lyzát, který vedle lambdaRS45-fága obsahuje také rekombinantní serA5-nesoucí lambdaRS45-deriváty (Simons a kol., 1987, Gene 53: 85 - 96).

10 Pro selekci na rekombinantní lambdaRS45-deriváty se použije serA-kmen PC1523 (CGSC#:5421). K tomu se PC1523 infikuje heterogenním lambda-lyzátem (viz výše) a potom se zaočkuje na kanamycin, obsahující (25 mg/l) LB-plotny. Získané lyzogenní, kanamycin-rezistentní klony se potom testují na svojí schopnost růstu na plotnách s minimálním médiem bez serinu. Zvolí se serin-prototrofní kmen a tento se použije pro výrobu homogenního serA5-lambda-lyzátu (UV-indukcí, Simons a kol., 1987, Gene 53: 85 - 86).

15 Tímto homogenním serA5-lambda-lyzátem se infikuje tryptofan-produkční kmen SV164. Získaný kmen SV164 att-lambda: serA5 se fermentuje postupem, popsaným v příkladě 4. Odpovídající médium obsahuje namísto tetracyklinu jako selekční agens vždy 25 mg/l kanamycinu.

20 Výtěžky tryptofanu se pohybují okolo 12,5 g/l, přičemž při použití stejného kmene bez serA5 se dosáhne výtěžku 3,5 g/l.

25 Příklad 4

Produkce tryptofanu Corynebakteriemi

30 Plazmid pGH5 se rozštěpí pomocí restrikčních enzymů SalI a HindIII (firmy Boehringer Mannheim GmbH) a z „low-melting“-agarózového gelu se izoluje 2 kb veliký, serA5-gen nesoucí fragment DNA. Fragment DNA se stejně, jako je popsáno v příkladě 2, zpracuje působením Klenow-fragmentu DNA-polymerázy I z E. coli (firmy Boehringer Mannheim GmbH) pro dosažení hladkého konce. Vektor pWST1 se rozštěpí pomocí restrikčního enzymu SmaI (firmy Boehringer) a liguje se fragmentem DNA s hladkým koncem. Vektor pWST1 je 35 univerzální vektor pro E. coli/corynebakterium a může se replikovat jak v Corynebakteriích, tak v E. coli. Corynebakteriální replikou tohoto vektoru pochází z kmene Corynebacterium glutamicum ATCC 19 223. Výroba vektoru pWST1 je popsána v USA 4 965 197. Ligační vsázka se využije k tomu, aby se transformoval kmen E. coli PC1523. Komplementující plazmid byl nazván pGH5/III (obr. 12).

40 Plazmid pGH5/III se využije k tomu, aby se transformoval tryptofan-produkující kmen Corynebacterium glutamicum ATCC 21 851. Transformace se provádí přes elektroporaci pomocí techniky, vyčerpávajícím způsobem popsané H. Wolfem a kol., 1989, Appl. Microbiol. Biotechnol. 30: 283 - 289. Klony, které nesou rekombinantní plazmid pGH5/III, se selektují přes 45 plazmid-kódovanou kanamycinovou rezistenci na agarových plotnách s 25 mg/l kanamycinu.

Plazmid pGC3 se rozštěpí pomocí restrikčních enzymů SphI a SalI. 3 kb fragment DNA, který nese divoký typ serA-alely, se přečistí a výše popsaným způsobem se liguje do vektoru pWST1. Získaný vektor pGC3 (obr. 13) se využije k transformaci Corynebacterium glutamicum 50 ATCC 21 851.

Analogicky se vyrobí kmen Corynebacterium glutamicum ATCC 21 581, který nese na plazmidu serA-alelu 1455.

Při fermentaci se ukázalo, že kmen, který nese na plazmidu serA5–alelu, dosahuje nejvyšších výtěžků tryptofanu.

5 Příklad 5

Vliv různých plazmidem kódovaných serA–alel na produkci tryptofanu u různých trpE–kmenů

Různými, v tabulce 3 uvedenými, produkčními kmeny tryptofanu, se v 10 ml Erlenmeyerových
10 baňkách zaočkuje 10 ml LB média (1 % tryptonu, 0,5 % kvasničného extraktu, 0,5 % chloridu
sodného), které bylo smíseno s 15 mg/l tetracyklinu. Po 8 až 9 hodinové inkubaci za třepání při
150 otáčkách za minutu při teplotě 30 °C se odpovídající předkultury převedou do 100 ml SM1–
média. SM1–médium obsahuje 5 g/l glukózy, 3 g/l dihydrogenfosforečnanu draselného, 12 g/l
hydrogenfosforečnanu draselného, 0,1 g/l síranu amonného, 0,3 g/l heptahydrátu síranu
15 hořečnatého, 15 mg/l dihydrátu chloridu vápenatého, 2 mg/l heptahydrátu síranu železnatého,
1 g/l dihydrátu citrátu trojsodného, 1 ml/l roztoku stopových prvků (viz níže), 40 mg/l L–
fenylalaninu, 40 mg/l L–tyrosinu, 5 mg/l vitamínu B1 a 15 mg/l tetracyklinu. Roztok stopových
prvků sestává z 0,15 g/l dihydrátu molybdenanu sodného, 2,5 g/l kyseliny borité, 0,7 g/l
20 hexahydrátu chloridu kobaltnatého, 0,25 g/l pentahydrátu síranu měďnatého, 1,6 g/l tetrahydrátu
chloridu manganatého a 0,3 g/l heptahydrátu síranu zinečnatého.

Kultury se třepou v jednotlivých Erlenmeyerových baňkách při teplotě 30 °C po dobu 12 až
16 hodin při 150 otáčkách za minutu. Po této inkubaci je hodnota OD₆₀₀ v rozmezí 2 až 4. Další
fermentace se provádí ve výzkumných fermentorech BIOSTAT[®]M firmy Braun Melsungen.
25 Používá se kultivační nádoba s celkovým objemem 2 litry.

Médium obsahuje 17,5 g/l glukózy, 5 g/l síranu amonného, 0,5 g/l chloridu sodného, 0,3 g/l
heptahydrátu síranu hořečnatého, 15 mg/l dihydrátu chloridu vápenatého, 75 mg/l heptahydrátu
síranu železnatého, 1 g/l dihydrátu citrátu trojsodného, 1,5 g/l dihydrogenfosforečnanu
30 draselného, 1 ml roztoku stopových prvků (viz výše), 5 mg/l vitamínu B1 (thiamin), 0,75 g/l L–
fenylalaninu, 0,75 g/l L–tyrosinu, 2,5 g/l kvasničného extraktu (Difco), 2,5 g/l tryptonu (difco) a
20 mg/l tetracyklinu.

Koncentrace glukózy se ve fermentoru udržuje dávkováním 700 g/l (w/v) glukózového roztoku
35 (autoklávovaného) na 17,5 g/l. Před zaočkováním se do fermentačního média přidá tetracyklin až
na konečnou koncentraci 20 mg/l. Dále se udržuje hodnota pH přiváděním 25 % roztoku
hydroxidu amonného na 6,7.

100 ml předkultury se pro zaočkování přečerpá do fermentační nádoby. Výchozí objem činí asi
40 1 litr. Kultury se nejprve míchají při 400 otáčkách za minutu a vzdušní se 1,5 vvm stlačeného
vzduchu, zbaveného zárodků pomocí sterilního filtru. Fermentace se provádí při teplotě 30 °C.

Hodnota pH se udržuje automatickým dávkováním 25 % hydroxidu amonného na 6,7. Sycení
kyslíkem ve fermentačním médiu se v žádném okamžiku fermentace nenechá poklesnout pod
45 20 %. Sycení kyslíkem se při fermentaci udržuje pomocí rychlosti míchání.

Ve dvouhodinových až tříhodinových periodách se zjišťuje obsah glukózy v živém roztoku,
optická hustota a výtěžek tryptofanu. Stanovení glukózy se provádí enzymaticky pomocí
glukózového analyzátoru firmy Ysi. Koncentrace glukózy se nastavuje kontinuálním živením
50 v rozmezí 5 až 20 g/l.

Obsah tryptofanu v médiu po fermentaci se stanovuje pomocí HPLC. Médium se rozděljuje na
Nucleosilu 100–7/C8 (250/4 mm; Macherey–Nagel). Sloupec se provozuje izokraticky
s hodnotou toku 2 ml/min. Jako pohyblivá fáze se používá směs vody a acetonitrilu (83/17), do

které se přidává pro litr 0,1 ml kyseliny fosforečné (85 %). Detekuje se buď pomocí diodového arraydetektoru, nebo při pevné vlnové délce 215, popřípadě 275 nm.

- Po 44 až 50 hodinách se fermentace ukončí. Produkovaná množství tryptofanu v g/l z těchto fermentací po 48 hodinách jsou shrnuta v tabulce 3.

Tabulka 3

Výtěžky tryptofanu s různými kombinacemi serA/trpE

	serAWT	serA5	serA1508	serA11	serA1455
trpE0	15,7	20,2	nestanov.	Nestanov.	6,7
trpE5	12,5	18,9	15,0	10,0	7,5
trpE8	11,6	24,1	13,8	24,0	4,0
trpE6	7,5	18,0	nestanov.	11,5	3,9

Sekvenční protokol:

15

(1) Všeobecné informace:

(i) Přihlašovatel:

20

(A) Jméno: Consorcium für elektrochemische
Industrie GmbH

(B) Ulice: Zielstattstr. 20

(C) Místo: Mnichov

(E) Stát: Německo

(F) PSČ: 81379

25

(G) Telefon: 089-62792686

(H) Telefax: 089-62792795

(ii) Název vynálezu: Mikroorganismy pro produkci tryptofanu a způsob jejich výroby

30

(iii) Počet sekvencí: 14

(iv) Počítačově čitelná forma:

35

(A) Nosič dat: Floppy disk

(B) Computer: IBM PC kompatibilní

(C) Pracovní systém: PC-DOS/MS-DOS

(D) Software: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

40

(2) Informace k SEQ ID NO: 1:

(i) Charakteristika sekvence:

45

(A) Délka: 52 aminokyselin

(B) Druh: aminokyseliny

(C) Forma řetězce: jednotlivý

(D) Topologie: lineární

(ii) Druh molekuly: protein

- (iii) Hypoteticky: ano
- (v) Druh fragmentu: C-terminus
- 5 (vi) Původ:
(A) Organismus: Escherichia coli
(B) Kmen: B
- 10 (vii) Bezprostřední původ:
(B) Klon: pGC3
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 1:
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 15 | Ala | Glu | Gln | Gly | Val | Asn | Ile | Ala | Ala | Gln | Tyr | Leu | Gln | Thr | Ser |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 |
| | Ala | Gln | Met | Gly | Tyr | Val | Val | Ile | Asp | Ile | Glu | Ala | Asp | Glu | Asp |
| | | | | 20 | | | | | | 25 | | | | | 30 |
| | Val | Ala | Glu | Lys | Ala | Leu | Gln | Ala | Met | Lys | Ala | Ile | Pro | Gly | Thr |
| 20 | | | | 35 | | | | | | 40 | | | | | 45 |
| | Ile | Arg | Ala | Arg | Leu | Leu | Tyr | | | | | | | | |
| | | | | 50 | | | | | | | | | | | |
- 25 (2) Informace k SEQ ID NO: 2:
- (i) Charakteristika sekvence:
(A) Délka: 51 aminokyselin
(B) Druh: aminokyseliny
30 (C) Forma řetězce: jednotlivý
(D) Topologie: lineární
- (ii) Druh molekuly: protein
- 35 (iii) Hypotetický: ano
- (v) druh fragmentu: C-terminus
- (vi) Původ:
40 (A) Organismus: Escherichia coli
(B) Kmen: B
- (vii) Bezprostřední původ:
(B) Klon: pGH5
- 45 (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 2:

	Ala	Glu	Gln	Gly	Val	Asn	Ile	Ala	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Thr	Ser
	1				5					10					15
	Ala	Gln	Met	Gly	Tyr	Val	Val	Ile	Asp	Ile	Glu	Ala	Asp	Glu	Asp
					20					25					30
5	Val	Ala	Glu	Lys	Ala	Leu	Gln	Ala	Met	Lys	Ala	Ile	Pro	Gly	Thr
					35					40					45
	Ile	Arg	Ala	Arg	Leu	Leu									
					50										

10

(2) Informace k SEQ ID NO: 3:

- (i) Charakteristika sekvence:
 (A) Délka: 56 aminokyselin
 (B) Druh: aminokyseliny
 (C) Forma řetězce: jednotlivý
 (D) Topologie: lineární
- (ii) Druh molekuly: protein
- (iii) Hypoteticky: ano
- (v) druh fragmentu: C-terminus
- (vi) Původ:
 (A) Organismus: Escherichia coli
 (B) Kmen: B
- (vii) Bezprostřední původ:
 (B) Klon: pKB1508
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 3:

35	Ala	Glu	Gln	Gly	Val	Cys	Ser	Arg	Ala	Asn	Ile	Ala	Ala	Gln	Tyr
	1				5					10					15
	Leu	Gln	Thr	Ser	Ala	Gln	Met	Gly	Tyr	Val	Val	Ile	Asp	Ile	Glu
					20					25					30
	Ala	Asp	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Lys	Ala	Leu	Gln	Ala	Met	Lys	Ala
40					35					40					45
	Ile	Pro	Gly	Thr	Ile	Arg	Ala	Arg	Leu	Leu	Tyr				
					50					55					

45 (2) Informace k SEQ ID NO: 4:

- (i) Charakteristika sekvence:
 (A) Délka: 55 aminokyselin
 (B) Druh: aminokyseliny
 (C) Forma řetězce: jednotlivý
 (D) Topologie: lineární
- (ii) Druh molekuly: protein
- (iii) Hypoteticky: ano

55

(v) druh fragmentu: C-terminus

(vi) Původ:

(A) Organismus: Escherichia coli

(B) Kmen: B

(vii) Bezprostřední původ:

(B) Klon: pGH11

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 4:

Ala	Glu	Gln	Gly	Val	Cys	Ser	Arg	Ala	Asn	Ile	Ala	Ala	Gln	Tyr
1				5					10					15
Leu	Gln	Thr	Ser	Ala	Gln	Met	Gly	Tyr	Val	Val	Ile	Asp	Ile	Glu
				20					25					30
Ala	Asp	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Lys	Ala	Leu	Gln	Ala	Met	Lys	Ala
				35					40					45
Ile	Pro	Gly	Thr	Ile	Arg	Ala	Arg	Leu	Leu					
				50					55					

(2) Informace k SEQ ID NO: 5:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 47 aminokyselin

(B) Druh: aminokyseliny

(C) Forma řetězce: jednotlivý

(D) Topologie: lineární

(ii) Druh molekuly: protein

(iii) Hypoteticky: ano

(v) druh fragmentu: C-terminus

(vi) Původ:

(A) Organismus: Escherichia coli

(B) Kmen: B

(vii) Bezprostřední původ:

(B) Klon: pKB1455

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 5:

Ala	Glu	Gln	Gly	Val	Asn	Ile	Ala	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Thr	Ser
1				5					10					15
Ala	Gln	Met	Gly	Tyr	Val	Val	Ile	Asp	Ile	Glu	Ala	Asp	Glu	Asp
				20					25					30
Val	Ala	Glu	Lys	Ala	Leu	Gln	Ala	Met	Lys	Ala	Ile	Pro	Gly	Thr
				35					40					45
Ile	Arg													

(2) Informace k SEQ ID NO: 6:

- 5 (i) Charakteristika sekvence:
 (A) Délka: 32 aminokyselin
 (B) Druh: aminokyseliny
 (C) Forma řetězce: jednotlivý
 (D) Topologie: lineární
- 10 (ii) Druh molekuly: protein
- (iii) Hypoteticky: ano
- (v) druh fragmentu: inertní
- 15 (vi) Původ:
 (A) Organismus: Escherichia coli
 (B) Kmen: YMC9

20 (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 6:

Asn Pro Thr Ala Leu Phe His Gln Leu Cys Gly Asp Arg Pro Ala
 1 5 10 15
 Thr Leu Leu Leu Glu Ser Ala Asp Ile Asp Ser Lys Asp Asp Leu
 20 25 30
 25 Lys Ser

(2) Informace k SEQ ID NO: 7:

- 30 (i) Charakteristika sekvence:
 (A) Délka: 32 aminokyselin
 (B) Druh: aminokyseliny
 (C) Forma řetězce: jednotlivý
 (D) Topologie: lineární
- 35 (ii) Druh molekuly: protein
- (iii) Hypoteticky: ano
- 40 (iii) Antisense: ne
- (v) druh fragmentu: inertní
- (vi) Původ:
 45 (A) Organismus: Escherichia coli
 (B) Kmen: PD103
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 7:

	Asn	Pro	Thr	Ala	Leu	Phe	His	Gln	Leu	Cys	Gly	Asp	Arg	Pro	Ala
	1				5					10					15
	Thr	Leu	Leu	Leu	Glu	S									
					20					25					30
5	Glu	Ser													

(2) Informace k SEQ ID NO: 8:

- 10 (i) Charakteristika sekvence:
 (A) Délka: 32 aminokyselin
 (B) Druh: aminokyseliny
 (C) Forma řetězce: jednotlivý
 (D) Topologie: lineární
- 15 (ii) Druh molekuly: protein
- (iii) Hypoteticky: ano
- 20 (v) druh fragmentu: inertní
- (vi) Původ:
 (A) Organismus: Escherichia coli
 (B) Kmen: KB862
- 25 (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 8:

	Asn	Ser	Thr	Ala	Leu	Phe	His	Gln	Leu	Cys	Gly	Asp	Arg	Pro	Ala
	1				5					10					15
30	Thr	Leu	Leu	Leu	Glu	Ser	Ala	Asp	Ile	Asp	Ser	Lys	Asp	Asp	Leu
					20					25					30
	Lys	Ser													

35 (2) Informace k SEQ ID NO: 9:

- (i) Charakteristika sekvence:
 (A) Délka: 32 aminokyselin
 (B) Druh: aminokyseliny
 (C) Forma řetězce: jednotlivý
 (D) Topologie: lineární
- 40 (ii) Druh molekuly: protein
- (iii) Hypoteticky: ano
- 45 (v) druh fragmentu: inertní
- (vi) Původ:
 (A) Organismus: Escherichia coli
 (B) Kmen: SV163
- 50 (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 9:

	Asn	Pro	Thr	Ala	Leu	Phe	His	Gln	Leu	Cys	Gly	Asp	Arg	Pro	Ala
1					5					10					15
	Thr	Leu	Leu	Leu	Glu	Phe	Ala	Asp	Ile	Asp	Ser	Lys	Asp	Asp	Leu
					20					25					30
5	Glu	Ser													

(2) Informace k SEQ ID NO: 10:

- 10 (i) Charakteristika sekvence:
 (A) Délka: 32 aminokyselin
 (B) Druh: aminokyseliny
 (C) Forma řetězce: jednotlivý
 (D) Topologie: lineární
- 15 (ii) Druh molekuly: protein
- (iii) Hypoteticky: ano
- 20 (v) druh fragmentu: inertní
- (vi) Původ:
 (A) Organismus: Escherichia coli
 (B) Kmen: SV164
- 25 (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 10:

	Asn	Ser	Thr	Ala	Leu	Phe	His	Gln	Leu	Cys	Gly	Asp	Arg	Pro	Ala
1					5					10					15
30	Thr	Leu	Leu	Leu	Glu	Ser	Ala	Asp	Ile	Asp	Ser	Lys	Asp	Asp	Leu
					20					25					30
	Glu	Ser													

35 (2) Informace k SEQ ID NO: 11:

- (i) Charakteristika sekvence:
 (A) Délka: 32 párů bází
 (B) Druh: nukleová kyselina
 (C) Forma řetězce: obojí
 (D) Topologie: lineární
- 40 (ii) Druh molekuly: DNA
- 45 (iii) Hypoteticky: ne
- (iii) Antisenze: ne
- (vi) Původ:
 (A) Organismus: in vitro syntetizovaný fragment DNA
- 50 (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 11:

AGCTTATTAC AGCAGACGGG CGCGAATGGA TC
32

5 (2) Informace k SEQ ID NO: 12:

- (i) Charakteristika sekvence:
 - (A) Délka: 12 párů bází
 - (B) Druh: nukleová kyselina
 - 10 (C) Forma řetězce: dvojitá
 - (D) Topologie: lineární
- (ii) Druh molekuly: DNA
- 15 (iii) Hypoteticky: ne
- (iii) Antisenze: ne
- (vi) Původ:
 - 20 (A) Organismus: in vitro syntetizovaný fragment DNA
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 12:

25 TGCTCTAGAG CA
12

(2) Informace k SEQ ID NO: 13:

- 30 (i) Charakteristika sekvence:
 - (A) Délka: 1233 párů bází
 - (B) Druh: nukleová kyselina
 - (C) Forma řetězce: dvojitá
 - 35 (D) Topologie: lineární
- (ii) Druh molekuly: DNA (genomická)
- (iii) Hypoteticky: ne
- 40 (iii) Antisenze: ne
- (vi) Původ:
 - (A) Organismus: Escherichia coli
 - (B) Kmen: B
- 45 (x) Informace o zveřejnění:
 - (A) Autoři: Tobey K. I.
Grant G. A.
 - (B) Titul: The nucleotide sequence of the serA gene of Escherichia coli and the
 - 50 amino acid sequence of the encoded protein, d-3-phosphoglycerate.
 - (C) Časopis: J. Biol. Chem.
 - (D) Díl: 261
 - (E) Strana: 12179 - 12183
 - (G) Datum: 1986

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 13:

```

5  ATG GCA AAG GTA TCG CTG GAG AAA GAC AAG AAT AAG TTT CGT CGT
   48
   Met Ala Lys Val Ser Leu Glu Lys Asp Lys Ile Lys Phe Leu Leu
   1      5      10      15
   GTA GAA GGC GTG CAC CAA AAG GCG CTG GAA AGC CTT CGT GCA GCT
   96
10  Val Glu Gly Val His Gln Lys Ala Leu Glu Ser Leu Arg Ala Ala
   20      25      30
   GGT TAC ACC AAC ATC GAA TTT CAC AAA GGC GCG CTG GST GAT GAA
   144
   Gly Tyr Thr Asn Ile Glu Phe His Lys Gly Ala Leu Asp Asp Glu
   15      35      40      45
   CAA TAA AAA GAA TCC ATC CGC GAT GCC CAC TTC ATC GGC CTG CGA
   192
   Gln Leu Lys Glu Ser Ile Arg Asp Ala His Phe Ile Gly Leu Arg
   50      55      60
20  TCC CGT ACC CAT CTG ACT GAA GAC GTG ATC AAC GCC GCA GAA AAA
   240
   Ser Arg Thr His Leu Thr Glu Asp Val Ile Asn Ala Ala Glu Lys
   65      70      75
   CTG GTC GCT ATT GGC TGT TTC TGT ATC GGA ACA AAC CAG GTT GAT
   288
25  Leu Val Ala Ile Gly Cys Phe Cys Ile Gly Thr Asn Gln Val Asp
   80      85      90
   CTG GAT GCG GCG GCA AAG CGC GGG ATC CCG GTA TTT AAC GCA CCG
   336
30  Leu Asp Ala Ala Ala Lys Arg Gly Ile Pro Val Phe Asn Ala Pro
   95      100      105
   TTC TCA AAT ACG CGC TCT GTT GCG GAG CTG GTG ATA GGC GAA CTG
   384
   Phe Ser Asn Thr Arg Ser Val Ala Glu Leu Val Ile Gly Glu Leu
   110      115      120
35  CTG CTG CTA TTG CGC GGC GGT CCG GAA GCC AAT GCT AAA GCG CAC
   432
   Leu Leu Leu Leu Arg Gly Val Pro Glu Ala Asn Ala Lys Ala His
   125      130      135
40  CGT GGC GTG TGG AAC AAA CTG GCG GCG GGT TCT TTT GAA GCG CGC
   480
   Arg Gly Val Trp Asn Lys Leu Ala Ala Gly Ser Phe Glu Ala Arg
   140      145      150
   GGC AAA AAG CTG GGT ATC ATC GGC TAC GGT CAT AAT GGT ACG CAA
   528
45  Gly Lys Lys Leu Gly Ile Ile Gly Tyr Gly His Ile Gly Thr Gln
   155      160      165
   TTG GGC ATT CTG GCT GAA TCG CTG GGA ATG TAT GTT TAC TTT TAT
   576
50  Leu Gly Ile Leu Ala Glu Ser Leu Gly Met Tyr Val Tyr Phe Tyr
   170      175      180
   GAT ATT GAA AAT AAA CTG CCG CTG GGC AAC GCC ACT CAG GTA CAG
   624
   Asp Ile Glu Asn Lys Leu Pro Leu Gly Asn Ala Thr Gln Val Gln
   185      190      195
55  CAT CTT TCT GAC CTG CTG AAT ATG AGC GAT GTG GTG AGT CTG CAT
   672

```

	His	Leu	Ser	Asp	Leu	Leu	Asn	Met	Ser	Asp	Val	Val	Ser	Leu	His
					200					205					210
	GTA	CCA	GAG	AAT	CCG	TCC	ACC	AAA	AAT	ATG	ATG	GGC	GCG	AAA	GAA
															720
5	Val	Pro	Glu	Asn	Pro	Ser	Thr	Lys	Asn	Met	Met	Gly	Ala	Lys	Glu
					215					220					225
	ATT	TCA	CTA	ATG	AAG	CCC	GGC	TCG	CTG	CTG	ATT	AAT	GCT	TCG	CGC
10	Ile	Ser	Leu	Met	Lys	Pro	Gly	Ser	Leu	Leu	Ile	Asn	Ala	Ser	Arg
					230					235					240
	GGT	ACT	GTG	GTG	GAT	ATT	CCG	GCG	CTG	TGT	GAT	GCG	CTG	GCG	AGC
	768														
	Gly	Thr	Val	Val	Asp	Ile	Pro	Ala	Leu	Cys	Asp	Ala	Leu	Ala	Ser
					245					250					255
15	AAA	CAT	CTG	GCG	GGG	GCG	GCA	ATC	GAC	GTA	TTC	CCG	ACG	GAA	CCG
	816														
	Lys	His	Leu	Ala	Gly	Ala	Ala	Ile	Asp	Val	Phe	Pro	Thr	Glu	Pro
					260					265					270
	GCG	ACC	AAT	AGC	GAT	CCA	TTT	ACC	TCT	CCG	CTG	TGT	GAA	TTC	GAC
20					864										
	Asp	Thr	Asn	Ser	Asp	Pro	Phe	Thr	Ser	Pro	Leu	Cys	Glu	Phe	Asp
					275					280					285
	AAC	GTC	CTT	CTG	ACG	CCA	CAC	ATT	GGC	GGT	TCG	ACT	CAG	GAA	GCG
					912										
25	Asn	Val	Leu	Leu	Thr	Pro	His	Ile	Gly	Gly	Ser	Thr	Gln	Glu	Ala
					290					295					300
	CAG	GAG	AAT	ATC	GGC	CTG	GAA	GTT	GCG	GGT	AAA	TTG	ATC	AAG	TAT
					960										
	Gln	Glu	Asn	Ile	Gly	Leu	Glu	Val	Ala	Gly	Lys	Leu	Ile	Lys	Tyr
30					305					310					315
	TCT	GAC	AAT	GGC	TCA	ACG	CTC	TCT	GCG	GTG	AAC	TTC	CCG	GAA	GTC
					1008										
	Ser	Asp	Asn	Gly	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Val	Asn	Phe	Pro	Glu	Val
					320					325					330
35	TCG	CTG	CCA	CTG	CAC	GGT	GGG	CGT	CGT	CTG	ATG	CAC	ATC	CAC	GAA
										1056					
	Ser	Leu	Pro	Leu	His	Gly	Gly	Arg	Arg	Leu	Met	His	Ile	His	Glu
					335					340					345
	AAC	CGT	CCG	GGC	GTG	CTA	ACT	GCG	CTG	AAC	AAA	ATC	TTC	GCC	GAG
40										1104					
	Asn	Arg	Pro	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Leu	Asn	Lys	Ile	Phe	Ala	Glu
					350					355					360
	CAG	GGC	GTC	AAC	ATC	GCC	GCG	CAA	TAT	CTG	CAA	ACT	TCC	GCC	CAG
										1152					
45	Gln	Gly	Val	Asn	Ile	Ala	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Thr	Ser	Ala	Gln
					365					370					375
	ATG	GGT	TAT	GTG	GTT	ATT	GAT	ATT	GAA	GCC	GAC	GAA	GAC	GTT	GCC
										1200					
	Met	Gly	Tyr	Val	Val	Ile	Asp	Ile	Glu	Ala	Asp	Glu	Asp	Val	Ala
50					380					385					390
	GAA	AAA	GCG	CTG	CAG	GCA	ATG	AAA	GCT	ATT	CCG	GGT	ACC	ATT	CGC
															1233
	Glu	Lys	Ala	Leu	Gln	Ala	Met	Lys	Ala	Ile	Pro	Gly	Thr	Ile	Arg
					395					400					405
55	GCC	CGT	CTG	CTG	TAC	TA									
	Ala	Arg	Leu	Leu	Tyr										
					410										

(2) Informace k SEQ ID NO: 14:

5 (i) Charakteristika sekvence:
 (A) Délka: 410 aminokyselin
 (B) Druh: Aminokyselina
 (D) Topologie: Lineární

10 (ii) Druh molekuly: Protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 14:

15	Met	Ala	Lys	Val	Ser	Leu	Glu	Lys	Asp	Lys	Ile	Lys	Phe	Leu	Leu	1	5	10	15
	Val	Glu	Gly	Val	His	Gln	Lys	Ala	Leu	Glu	Ser	Leu	Arg	Ala	Ala	20	25	30	
	Gly	Tyr	Thr	Asn	Ile	Glu	Phe	His	Lys	Gly	Ala	Leu	Asp	Asp	Glu	35	40	45	
20	Gln	Leu	Lys	Glu	Ser	Ile	Arg	Asp	Ala	His	Phe	Ile	Gly	Leu	Arg	50	55	60	
	Ser	Arg	Thr	His	Leu	Thr	Glu	Asp	Val	Ile	Asn	Ala	Ala	Glu	Lys	65	70	75	
	Leu	Val	Ala	Ile	Gly	Cys	Phe	Cys	Ile	Gly	Thr	Asn	Gln	Val	Asp	80	85	90	
25	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Lys	Arg	Gly	Ile	Pro	Val	Phe	Asn	Ala	Pro	95	100	105	
	Phe	Ser	Asn	Thr	Arg	Ser	Val	Ala	Glu	Leu	Val	Ile	Gly	Glu	Leu	110	115	120	
30	Leu	Leu	Leu	Leu	Arg	Gly	Val	Pro	Glu	Ala	Asn	Ala	Lys	Ala	His	125	130	135	
	Arg	Gly	Val	Trp	Asn	Lys	Leu	Ala	Ala	Gly	Ser	Phe	Glu	Ala	Arg	140	145	150	
	Gly	Lys	Lys	Leu	Gly	Ile	Ile	Gly	Tyr	Gly	His	Ile	Gly	Thr	Gln	155	160	165	
35	Leu	Gly	Ile	Leu	Ala	Glu	Ser	Leu	Gly	Met	Tyr	Val	Tyr	Phe	Tyr	170	175	180	
	Asp	Ile	Glu	Asn	Lys	Leu	Pro	Leu	Gly	Asn	Ala	Thr	Gln	Val	Gln	185	190	195	
40	His	Leu	Ser	Asp	Leu	Leu	Asn	Met	Ser	Asp	Val	Val	Ser	Leu	His	200	205	210	
	Val	Pro	Glu	Asn	Pro	Ser	Thr	Lys	Asn	Met	Met	Gly	Ala	Lys	Glu	215	220	225	
	Ile	Ser	Leu	Met	Lys	Pro	Gly	Ser	Leu	Leu	Ile	Asn	Ala	Ser	Arg	230	235	240	
45	Gly	Thr	Val	Val	Asp	Ile	Pro	Ala	Leu	Cys	Asp	Ala	Leu	Ala	Ser	245	250	255	
	Lys	His	Leu	Ala	Gly	Ala	Ala	Ile	Asp	Val	Phe	Pro	Thr	Glu	Pro	260	265	270	
50	Ala	Thr	Asn	Ser	Asp	Pro	Phe	Thr	Ser	Pro	Leu	Cys	Glu	Phe	Asp	275	280	285	
	Asn	Val	Leu	Leu	Thr	Pro	His	Ile	Gly	Gly	Ser	Thr	Gln	Glu	Ala	290	295	300	
	Gln	Glu	Asn	Ile	Gly	Leu	Glu	Val	Ala	Gly	Lys	Leu	Ile	Lys	Tyr	305	310	315	
55	Ser	Asp	Asn	Gly	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Val	Asn	Phe	Pro	Glu	Val	320	325	330	

Ser Leu Pro Leu His Gly Gly Arg Arg Leu Met His Ile His Glu
 335 340 345
 Asn Arg Pro Gly Val Leu Thr Ala Leu Asn Lys Ile Phe Ala Glu
 350 355 360
 5 Gln Gly Val Asn Ile Ala Ala Gln Tyr Leu Gln Thr Ser Ala Gln
 365 370 375
 Met Gly Tyr Val Val Ile Asp Ile Glu Ala Asp Glu Asp Val Ala
 380 385 390
 Glu Lys Ala Leu Gln Ala Met Lys Ala Ile Pro Gly Thr Ile Arg
 10 395 400 405
 Ala Arg Leu Leu Tyr
 410

15

PATENTOVÉ NÁROKY

20 1. Způsob výroby mikroorganismů, produkujících tryptofan, **vyznačující se tím**, že se mikroorganismy, které jsou deregulovány v alespoň jednom kroku biosyntézy tryptofanu, opatří serA-alelou, která má sníženou citlivost vůči inhibici serinem, přičemž

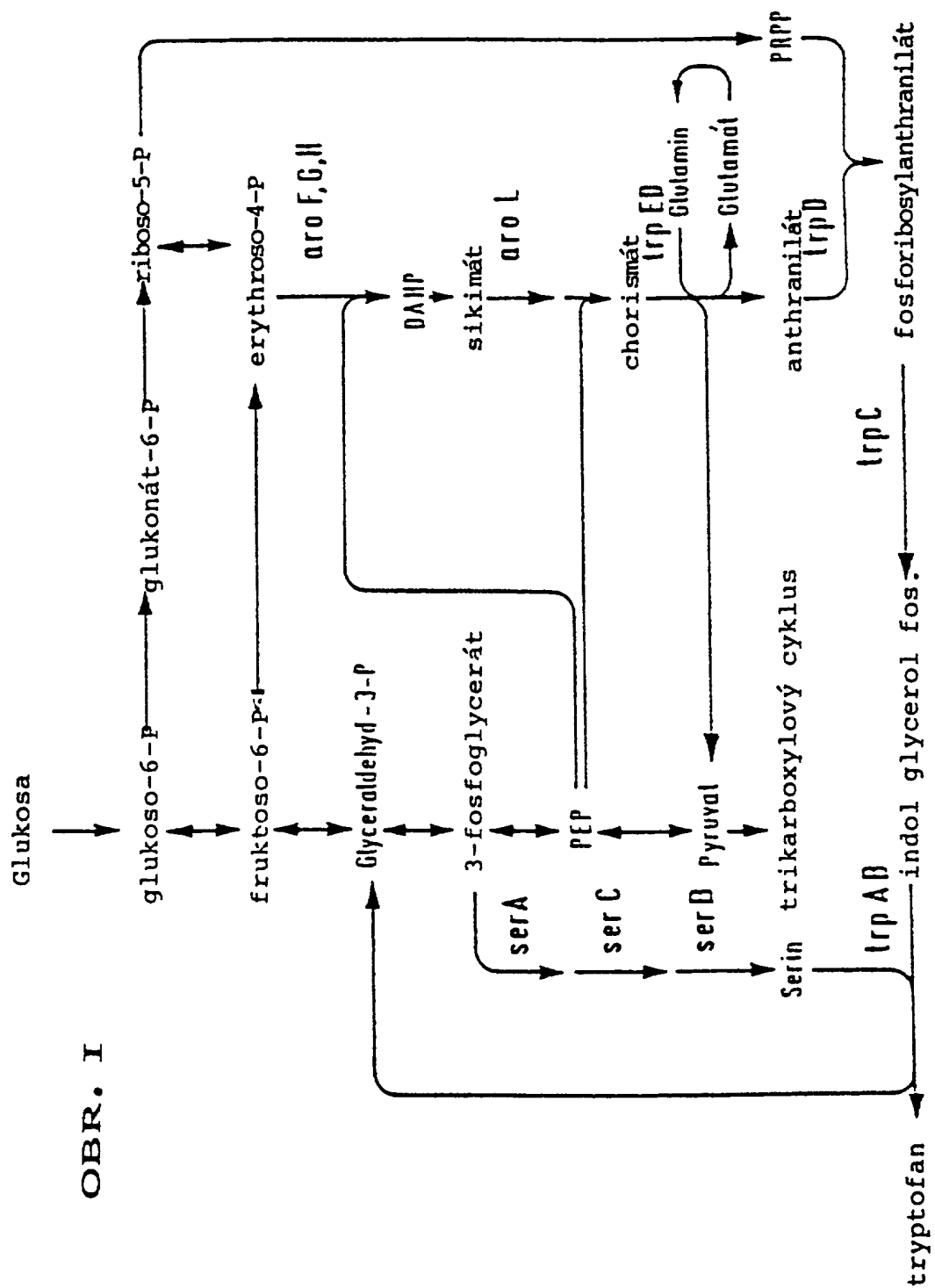
25 - mikroorganismy, které jsou deregulovány v alespoň jednom kroku biosyntézy tryptofanu, se podrobí mutagenезi a mutagenem zpracované populace organismů se podrobí selekci na klony se serA-geeny, které kódují pro serin necitlivé fosfoglycerátdehydrogenázy, nebo

30 - ser-alely, které kódují pro serin necitlivé fosfoglycerátdehydrogenázy, se vyrobí technikami genového inženýrství, výhodně technikami místně směřované mutagenезe, a takovéto alely se vnesou do mikroorganismů, které jsou deregulovány v alespoň jednom kroku biosyntézy tryptofanu, tak že se integrovaně vyskytují buď na autonomně replikovatelném rekombinantním vektoru, nebo v chromozomu kmene.

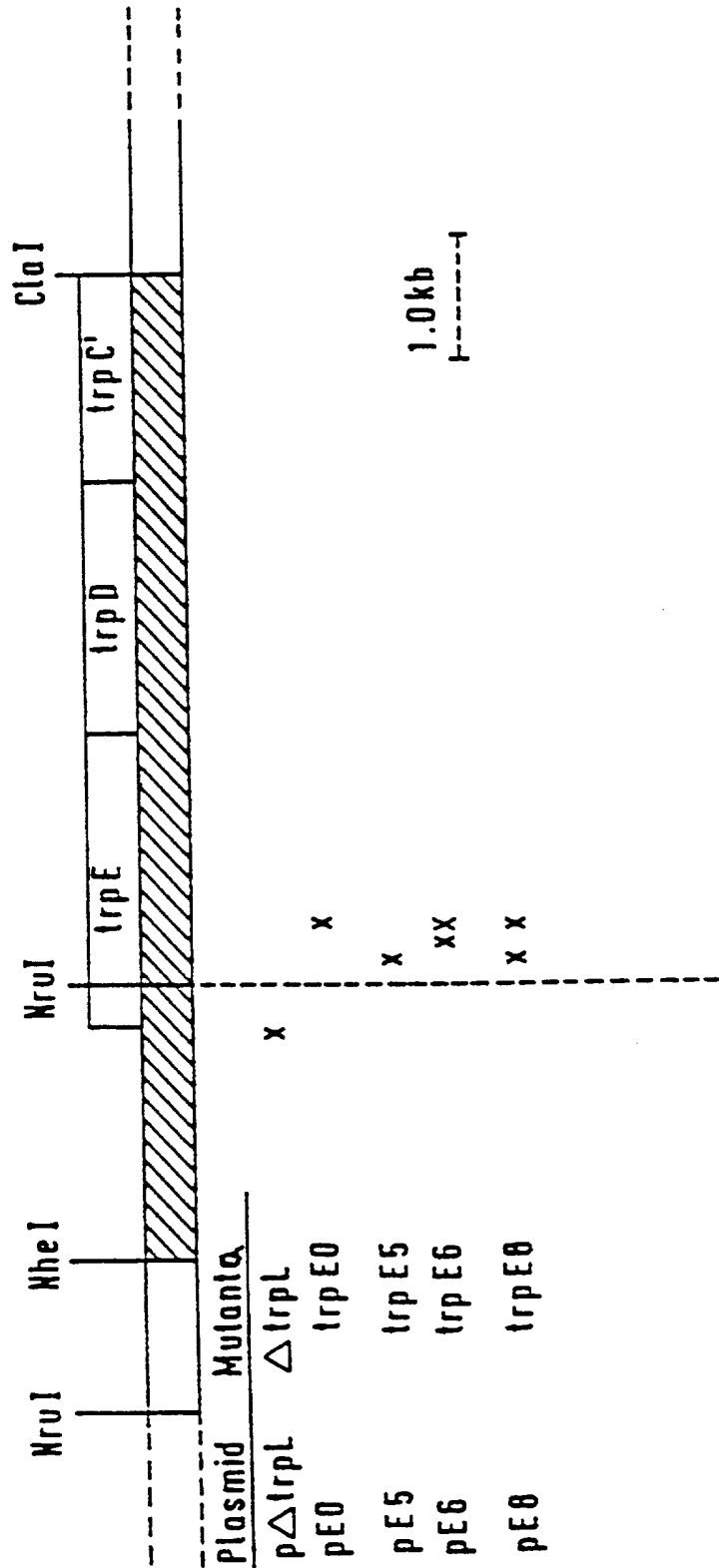
35 2. Použití mikroorganismů, vyrobených způsobem nároku 1, pro fermentativní produkci tryptofanu.

40

10 výkresů



OBR. 2



OBR. 3a

10	30	50
ATGGCAAAGGTATCGCTGGAGAAAGACAAGATTAAGTTTCTGCTGGTAGAAGGCGTGCAC		
MetAlaLysValSerLeuGluLysAspLysIleLysPheLeuLeuValGluGlyValHis		
70	90	110
CAAAAGGCGCTGGAAAGCCTTCGTGCAGCTGGTTACACCAACATCGAATTCACAAAGGC		
GlnLysAlaLeuGluSerLeuArgAlaAlaGlyTy-ThrAsnIleGluPheHisLysGly		
130	150	170
GCGCTGGATGATGAACAATTAAAAGAATCCATCCGCGATGCCCACTTCATCGGCCTGCGA		
AlaLeuAspAspGluGlnLeuLysGluSerIleArgAspAlaHisPheIleGlyLeuArg		
190	210	230
TCCCGTACCCATCTGACTGAAGACGTGATCAACGCCGCGAGAAAACTGGTCTGCTATTGGC		
SerArgThr-HisLeuThrGluAspValIleAsnAlaAlaGluLysLeuValAlaIleGly		
250	270	290
TGTTTCTGTATCGGAACAAACCAGGTTGATCTGGATGCGGCGGCAAAGCGCGGGATCCCG		
CysPheCysIleGlyThrAsnGlnValAspLeuAspAlaAlaAlaLysArgGlyIlePro		
310	330	350
GTATTTAACGCACCGTTCTCAAATACGCGCTCTGTTGCGGAGCTGGTGATTGGCGAACTG		
ValPheAsnAlaProPheSerAsnThrArgSerValAlaGluLeuValIleGlyGluLeu		
370	390	410
CTGCTGCTATTGCGCGGCGTGCCGGAAGCCAATGCTAAAGCGCACCGTGGCGTGTGGAAC		
LeuLeuLeuLeuArgGlyValProGluAlaAsnAlaLysAlaHisArgGlyValTrpAsn		

OBR. 3b

430 450 470
 AACTGGCGGCGGGTCTTTTGAAGCGCGCGGCAAAAAGCTGGGTATCATCGGCTACGGT
 LysLeuAlaAlaGlySerPheGluAlaArgGlyLysLysLeuGlyIleIleGlyTyrGly

490 510 530
 CATATTGGTACGCAATTGGGCATTCTGGCTGAATCGCTGGGAATGTATGTTTACTTTTAT
 HisIleGlyThrGlnLeuGlyIleLeuAlaGluSerLeuGlyMetTyrValTyrPheTyr

550 570 590
 GATATTGAAAATAAACTGCCGCTGGGCAACGCCACTCAGGTACAGCATCTTTCTGACCTG
 AspIleGluAsnLysLeuProLeuGlyAsnAlaThrGlnValGlnHisLeuSerAspLeu

610 630 650
 CTGAATATGAGCGATGTGGTGAGTCTGCAATGTACCAGAGAATCCGTCCACCAAAAATATG
 LeuAsnMetSerAspValValSerLeuHisValProGluAsnProSerThrLysAsnMet

670 690 710
 ATGGGCGCGAAAGAAATTTCACTAATGAAGCCCGGCTCGCTGCTGATTAATGCTTCGCGC
 MetGlyAlaLysGluIleSerLeuMetLysProGlySerLeuLeuIleAsnAlaSerArg

730 750 770
 GGTACTGTGGTGGATATTCCGGCGCTGTGTGATGCGCTGGCGAGCAAACATCTGGCGGGG
 GlyThrValValAspIleProAlaLeuCysAspAlaLeuAlaSerLysHisLeuAlaGly

790 810 830
 GCGGCAATCGACGTATTCCTGACGGAACCGCGACCAATAGCGATCCATTTACCTCTCCG
 AlaAlaIleAspValPheProThrGluProAlaThrAsnSerAspProPheThrSerPro

OBR. 3c

850 870 890
 CTGTGTGAATTCGACAACGTCCTTCTGACGCCACACATTGGCGGTTCGACTCAGGAAGCG
 LeuCysGluPheAspAsnValLeuLeuThrProHisIleGlyGlySerThrGlnGluAla

910 930 950
 CAGGAGAATATCGGCCTGGAAGTTGCGGGTAAATTGATCAAGTATTCTGACAATGGCTCA
 GlnGluAsnIleGlyLeuGluValAlaGlyLysLeuIleLysTyrSerAspAsnGlySer

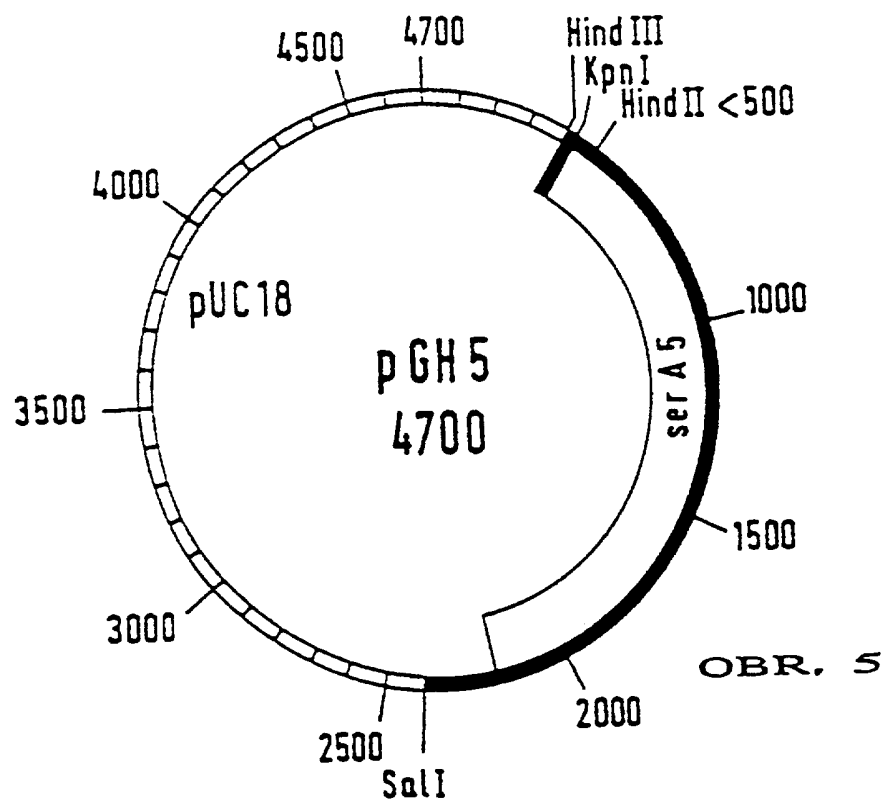
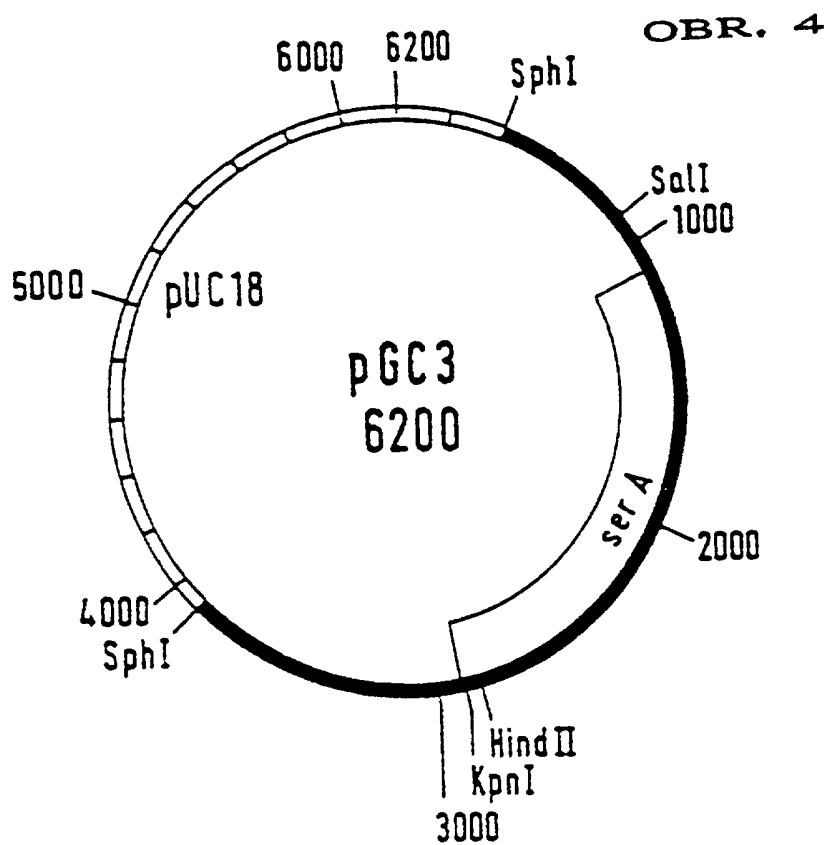
970 990 1010
 ACGCTCTCTGCGGTGAACTTCCCGGAAGTCTCGCTGCCACTGCACGGTGGGCGTCGTCTG
 ThrLeuSerAlaValAsnPheProGluValSerLeuProLeuHisGlyGlyArgArgLeu

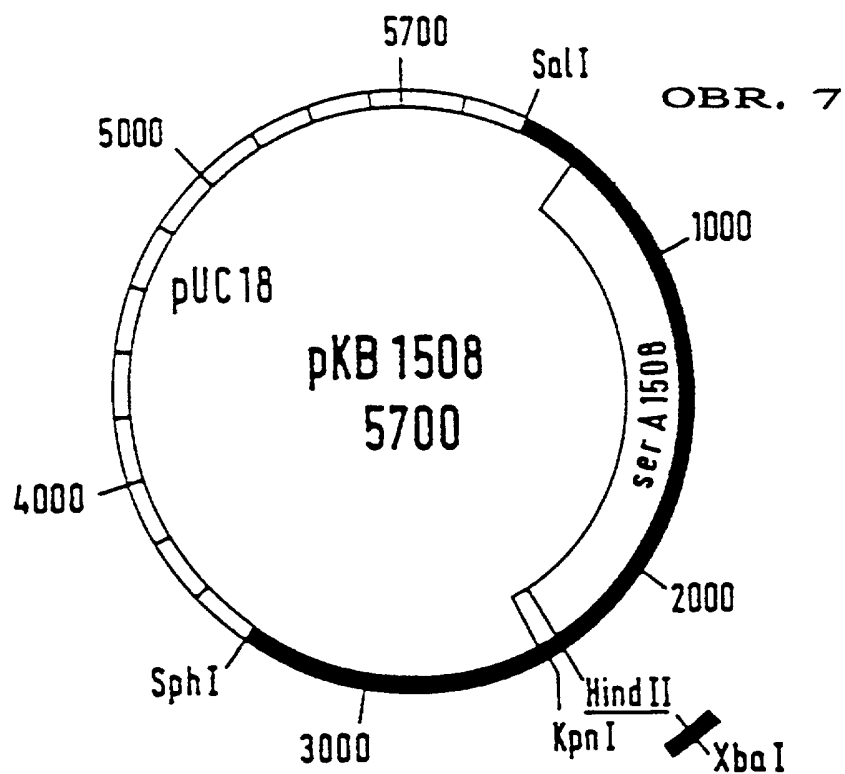
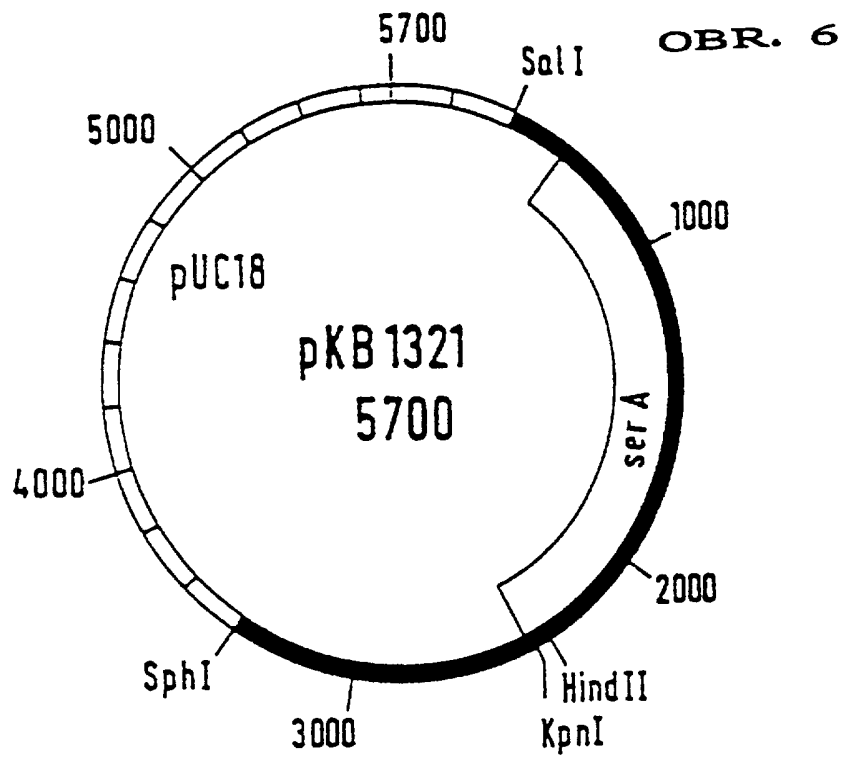
1030 1050 1070
 ATGCACATCCACGAAAACCGTCCGGGCGTGCTAACTGCGCTGAACAAAATCTTCGCCGAG
 MetHisIleHisGluAsnArgProGlyValLeuThrAlaLeuAsnLysIlePheAlaGlu

1090 1110 1130
 CAGGGCGTCAACATCGCCGCGCAATATCTGCAAACTTCCGCCCAGATGGGTTATGTGGTT
 GlnGlyValAsnIleAlaAlaGlnTyrLeuGlnThrSerAlaGlnMetGlyTyrValVal

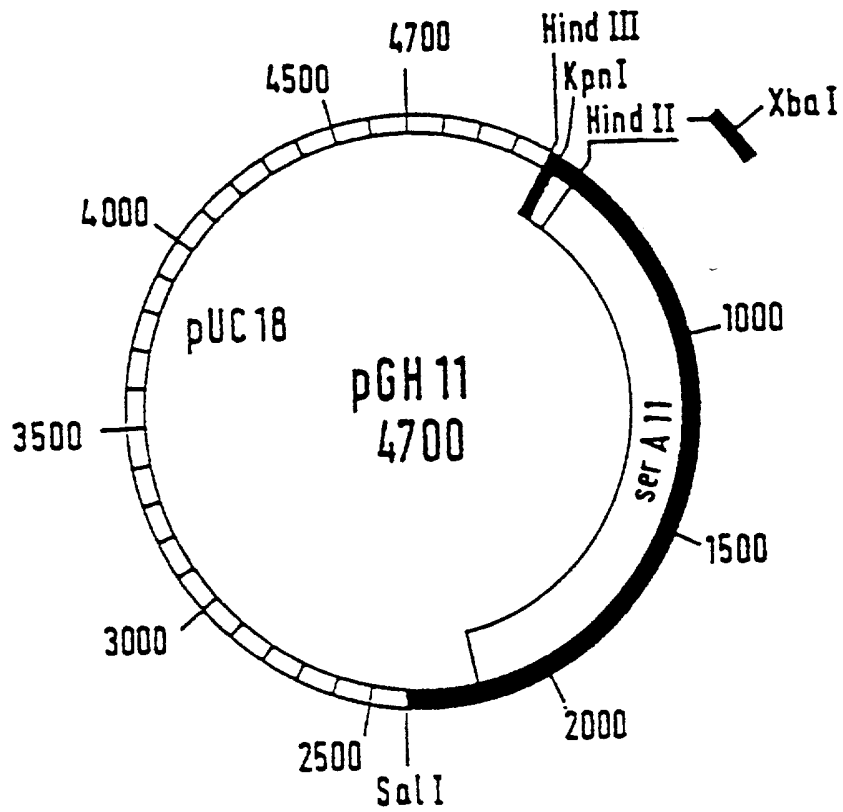
1150 1170 1190
 ATTGATATTGAAGCCGACGAAGACGTTGCCGAAAAAGCGCTGCAGGCAATGAAAGCTATT
 IleAspIleGluAlaAspGluAspValAlaGluLysAlaLeuGlnAlaMetLysAlaIle

1210 1230
 CCGGGTACCATTGCGCCCCGTCTGCTGTACTAA
 ProGlyThrIleArgAlaArgLeuLeuTyrEnd

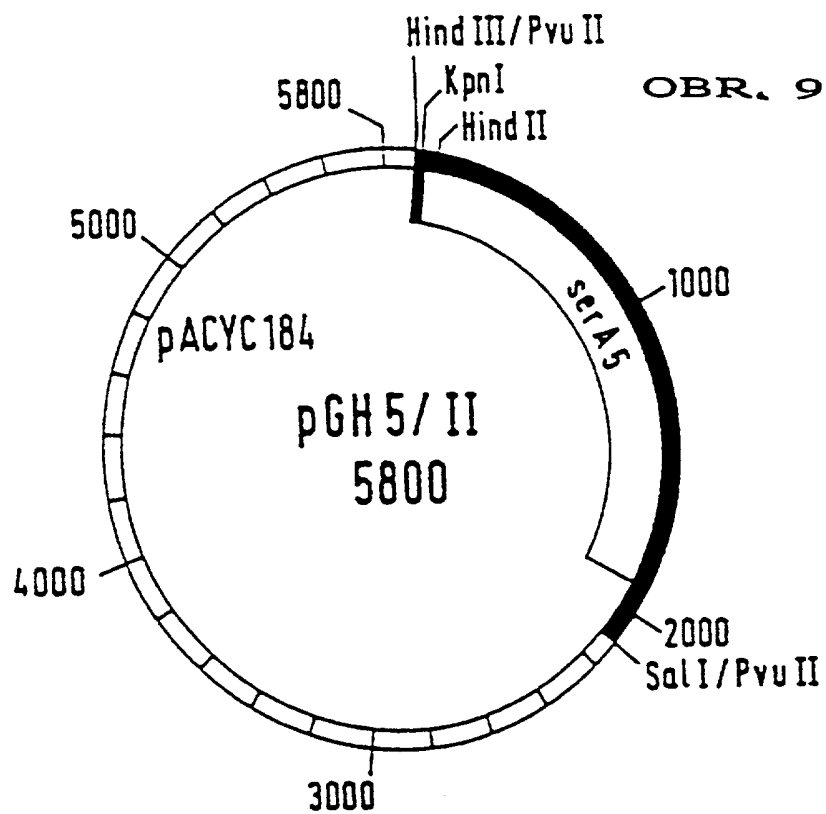




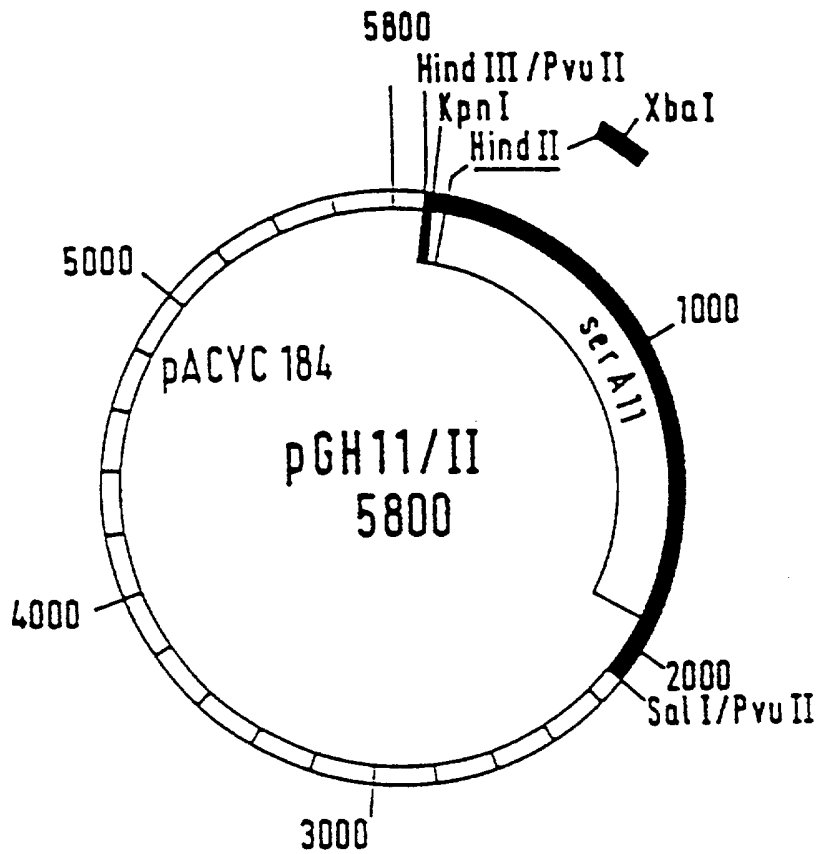
OBR. 8



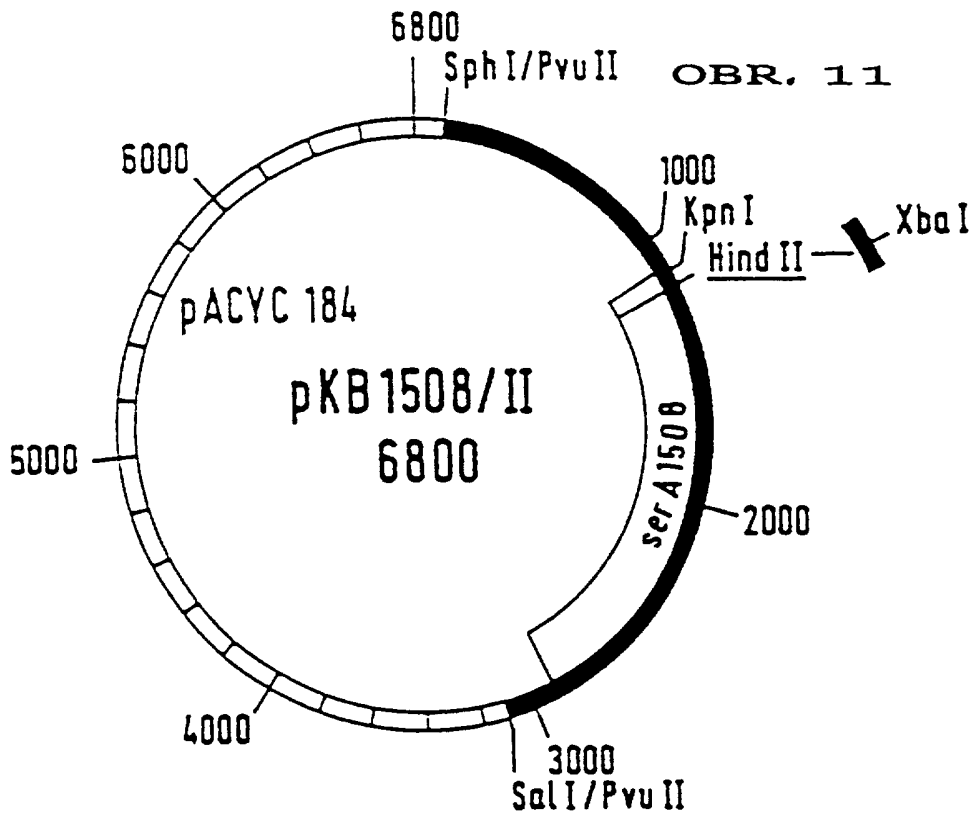
OBR. 9



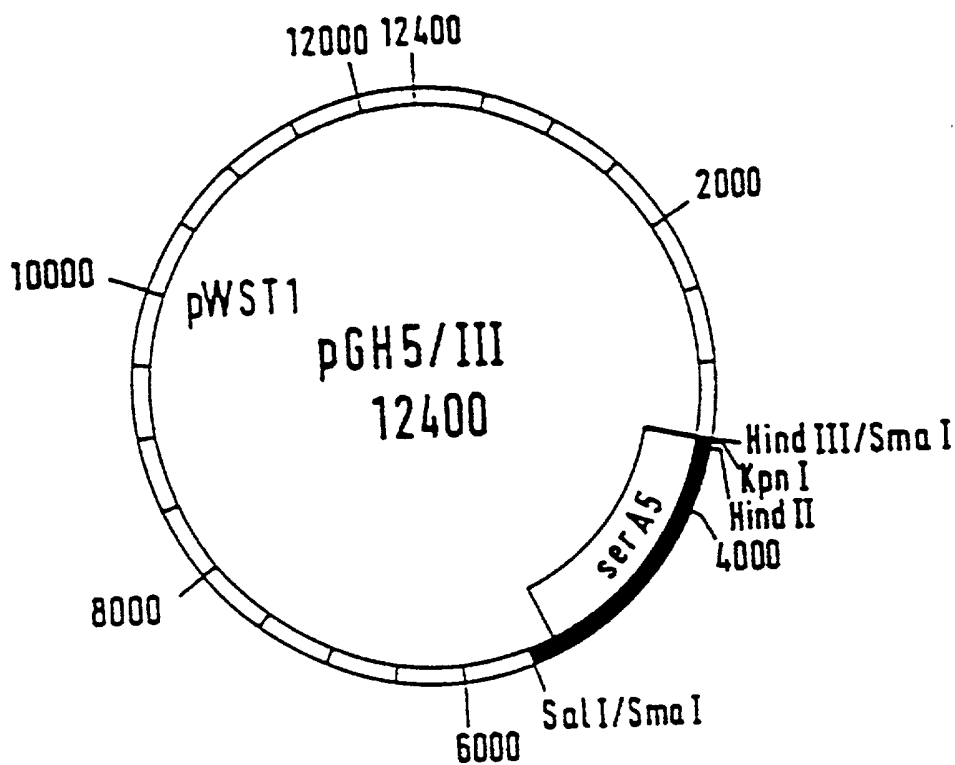
OBR. 10



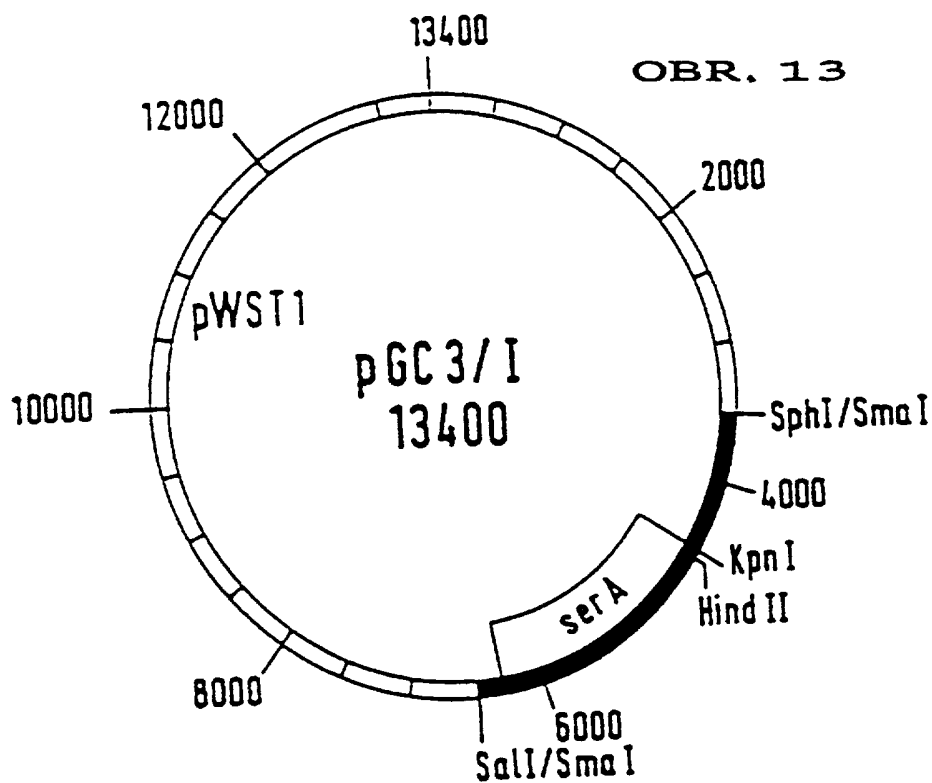
OBR. 11



OBR. 12



OBR. 13



Konec dokumentu