

K I V O N A T

A pck gént kódoló új nukleotid-szekvenciák

Coryneform baktériumokból izolált polinukleotid, amely a következőket tartalmazó csoportból választott polinukleotid-szekvenciát tartalmaz:

a) polinukleotid, amely legalább 70%-ban azonos a 2. számú szekvenciában található aminosav-szekvenciával rendelkező polipeptidet kódoló polinukleotiddal;

b) polinukleotid, amely legalább 70%-ban azonos a DSM 13047 számon letétbe helyezett *E. coli* törzsben a pK19mobsacBΔpck vektorban található pck gén által kifejezett polipeptidet kódoló polinukleotiddal;

c) polinukleotid, amely a 2. számú aminosav-szekvenciával legalább 70%-ban azonos aminosav-szekvenciával rendelkező polipeptidet kódol;

d) polinukleotid, amely az a), b) vagy c) polinukleotidokkal komplementer és

e) polinukleotid, amely az a), b), c) vagy d) polinukleotid-szekvenciának legalább 15 egymást követő bázisát tartalmazza.

Jellemezés a/c p

Benn

A pck gént kódoló új nukleotid-szekvenciák

A találmány tárgyát coryneform baktériumokból származó, a pck gént kódoló nukleotid-szekvenciák és L-aminosavaknak, különösen L-lizinnek és L-treoninnak a pck gén legyengítése révén történő fermentatív előállítására szolgáló eljárás képezi.

Aminosavak, különösen lizin és treonin az állati takarmányozásban, az élelmiszeriparban, a gyógyszeriparban és a humán gyógyászatban kerülnek felhasználásra.

Ismert, hogy ezeket az anyagokat coryneform baktérium törzsek, különösen *Corynebacterium glutamicum* fermentációjával állítják elő. Nagy jelentősége miatt állandóan javítják az előállítási eljárásokat. Az eljárások javításai érinthetnek fermentációs technikai intézkedéseket, például keverést és oxigénellátottságot, vagy a tápoldatok összetételét, mint például a cukorkoncentrációt a fermentáció során, vagy a végtermékké történő feldolgozást például ioncserés kromatográfiával, vagy magát a mikroorganizmus belső teljesítmény sajátosságait.

E mikroorganizmusok teljesítmény sajátosságainak javítására a mutagenézisnek, szelekciónak és mutánsok kiválasztásának módszereit alkalmazzák. Ilyen módon antimetabolitokkal szemben rezisztens vagy a szabályozás szempontjából fontos anyagcsere-termékekre nézve auxotróf törzseket kapnak, amelyek a kívánt aminosavat termelik.

Néhány éve a rekombináns DNS technika módszereit szintén alkalmazzák L-aminosavat termelő *Corynebacterium* törzsek javítására.

A feltalálók célja aminosavak javított fermentációs előállítására vonatkozó új intézkedések nyilvánosságra hozatala.

Aminosavak, különösen L-lizin és L-treonin az állati takarmányozásban, az élelmiszeriparban, a gyógyszeriparban és a humán gyógyászatban kerülnek felhasználásra. Ezért általános az érdeklődés ezen termékek előállítására szolgáló új, javított eljárások közreadására.

A találmány tárgyát coryneform baktériumokból származó olyan izolált polinukleotid képezi, amely a következőket tartalmazó csoportból választott polinukleotid-szekvenciát tartalmaz:

a) polinukleotid, amely legalább 70%-ban azonos a 2. számú szekvenciában található aminosav-szekvenciával rendelkező polipeptidet kódoló polinukleotiddal;

b) polinukleotid, amely legalább 70%-ban azonos a nevezett polipeptidet kódoló polinukleotiddal és a pEK-pckA (1. ábra) illetve a pEK-pckB (2. ábra) plazmidon található;

c) polinukleotid, amely a 2. számú aminosav-szekvenciával legalább 70%-ban azonos aminosav-szekvenciával rendelkező polipeptidet kódol;

d) polinukleotid, amely az a), b) vagy c) polinukleotidokkal komplementer és

e) polinukleotid, amely az a), b), c) vagy d) polinukleotid-szekvenciának legalább 15 egymást követő bázisát tartalmazza.

Szintén a találmány tárgyát képezi coryneform mikroorganizmusokban replikációra képes, előnyösen *Corynebacterium* eredetű rekombináns DNS, amely legalább az 1. számú szekvenciában bemutatott, pck gént kódoló nukleotid-szekvenciát tartalmazza.

Szintén a találmány tárgyát képezi az 1. igénypont szerinti, replikációra képes DNS, amely

i) az 1. számú szekvenciában bemutatott nukleotid-szekvenciát, vagy

ii) legalább egy, az i) szekvenciának a genetikai kód degeneráltságán belül megfelelő szekvenciát, vagy

iii) legalább egy, az i) vagy ii) szekvenciával komplementer szekvenciával hibridizáló szekvenciát, és/vagy adott esetben

iv) i)-ben működésre semleges szenz mutációkat tartalmaz.

A találmány további tárgyát képezi

a 2. igénypont szerinti polinukleotid, amely az 1. számú szekvenciában bemutatott nukleotid-szekvenciát tartalmazza,

a 2. igénypont szerinti polinukleotid, amely a 2. számú szekvenciában bemutatott aminosav-szekvenciát tartalmazó polipeptidet kódol,

az 1. igénypont szerinti polinukleotidot tartalmazó vektor, különösen pEK-pckA vagy pEK-pckB, amelyeket az 1. és 2. ábrán mutatunk be, és

gazdaszervezetként szolgáló coryneform baktériumok, amelyekbe beépítettük a Δpck deléciót.

Szintén a találmány tárgyát képezik lényegében olyan polinukleotid-szekvenciából álló polinukleotidok, amelyek megfelelő génbank hibridizációs screenelésével kaphatók, amelyek az 1. számú szekvenciának megfelelő polinukleotid-szekvenciát tartalmazó teljes gént olyan szondával tartalmazzák, amely a nevezett, 1. számú szekvencia szerinti polinukleotid szekvenciáját vagy annak fragmentumát tartalmazza és a nevezett DNS szekvencia izo-

lálása.

A találmány szerinti polinukleotid-szekvenciák alkalmasak RNS, cDNS és DNS hibridizációs szondaként foszfoenolpiruvát-karboxikinázt kódoló teljes hosszúságú cDNS izolálására és olyan cDNS vagy gén izolálására, amely a foszfoenolpiruvát-karboxikináz gén szekvenciájával nagymértékű hasonlóságot mutat.

A találmány szerinti polinukleotid-szekvenciák alkalmasak továbbá primerként foszfoenolpiruvát-karboxikinázt kódoló gének-ből DNS kinyerésére polimeráz láncreakcióval (PCR = polymerase chain reaction).

Az ilyen, szondaként vagy primerként szolgáló oligonukleotidok legalább 30, előnyösen legalább 20, különösen előnyösen legalább 15 egymást követő bázist tartalmaznak. Ugyanígy alkalmasak legalább 40 vagy 50 bázispár hosszúságú oligonukleotidok.

„Izolált” azt jelenti, hogy természetes környezetétől elválasztott.

„Polinukleotid” általában olyan poliribonukleotidokra és polidezoxiribonukleotidokra vonatkozik, ahol egyaránt lehet szó nem módosított RNS-ről és DNS-ről vagy módosított RNS-ről és DNS-ről.

„Polipeptidek” alatt olyan peptideket vagy fehérjéket értünk, amelyek peptidkötéssel kapcsolódó két vagy több aminosavat tartalmaznak.

A találmány szerinti polipeptidek magukban foglalják a 2. számú szekvencia szerinti polipeptidet, különösen olyanokat, amelyek PEP-karboxikináz biológiai aktivitással rendelkeznek és olyanokat is, amelyek legalább 70%-ban, előnyösen legalább 80%-

ban és különösen olyanokat, amelyek legalább 90-95%-ban azonosak a 2. számú szekvencia szerinti polipeptiddel és rendelkeznek a nevezett aktivitással.

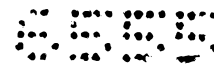
A találmány oltalmi körébe tartozik továbbá L-aminosavak, különösen L-lizin és L-treonin előállítására szolgáló eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan coryneform baktériumokat alkalmaz, amelyek már termelik az L-aminosavakat és amelyekben a pck gént kódoló nukleotid-szekvenciát legyengítjük, különösen alacsony szinten fejezzük ki.

A „legyengítés” fogalma ebben az összefüggésben egy mikroorganizmusban egy vagy több, a megfelelő DNS által kódolt enzim (fehérje) intracelluláris aktivitásának csökkentését vagy kikapcsolását jelenti azáltal, hogy például egy gyenge promótert vagy olyan gént illetve allélt alkalmazunk, amely egy megfelelő enzimet alacsonyabb aktivitással kódol illetve a megfelelő enzimet (fehérjét) inaktiválja és adott esetben ezeket az intézkedéseket kombinálja.

A találmány tárgyát képező mikroorganizmusok képesek glükózból, szacharózból, laktózból, fruktózból, maltózból, melaszából, keményítőből, cellulózból vagy glicerinből és etanolból L-aminosavak, különösen L-lizin és L-treonin előállítására. Coryneform baktériumok képviselőjeként különösen a *Corynebacterium* nemzetség jöhet szóba.

A *Corynebacterium* nemzetségen belül különösen a *Corynebacterium glutamicum* faj említésre méltó, amelynek L-aminosavakat termelő képessége ismert a szakmában.

A *Corynebacterium* nemzetség, különösen a *Corynebacterium*



glutamicum faj alkalmas törzsei például az ismert vad törzsek

Corynebacterium glutamicum ATCC13032

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870

Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539

Corynebacterium melassecola ATCC17965

Brevibacterium flavum ATCC 14067

Brevibacterium lactofermentum ATCC 13869 és

Brevibacterium divaricatum ATCC 14020

és ezekből előállított, L-aminosavakat termelő mutánsok illetve törzsek,

mint például az L-lizint termelő törzsek

Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709

Brevibacterium flavum FERM-P 1708

Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712

Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463

Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464 és

Corynebacterium glutamicum DSM 5714

vagy például az L-treonint termelő törzsek

Corynebacterium glutamicum ATCC 21649

Brevibacterium flavum BB69

Brevibacterium flavum DSM 5399

Brevibacterium lactofermentum FERM-BP 269

Brevibacterium lactofermentum TBB-10

Corynebacterium glutamicum MH20-22B-DR17.

A feltalálóknak sikerült az új, a foszfoenolpiruvát-karboxi-kináz (PEP-karboxikináz) (EC 4.1.1.49) enzimet kódoló *pck* gént

izolálni *C. glutamicum*-ból.

A pck gén vagy más gének *C. glutamicum*-ból történő izolálásához először ennek a mikroorganizmusnak egy génbankját készítjük el *E. coli*-ban. Génbankok létesítését általánosan ismert tankönyvek és kézikönyvek írják le. Példaként megemlíthető a következő tankönyv [Winnacker, Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie, Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland (199)] és kézikönyv [Sambrook et al., Molecular cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))]. Nagyon ismert génbank az *E. coli* K-12 W3110 törzsé, amelyet Kohara és munkatársai [Cell 50, 495-508 (1987)] λ -vektorokban hoztak létre. Bathe és munkatársai [Mol. Gen. Genetics 252, 255-265 (1996)] *C. glutamicum* ATCC 13032 génbankot írnak le, amelyet a SuperCos I kozmidvektor [Wahl et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 84, 2160-2164 (1987)] segítségével *E. coli* K-12 NM554 törzsben [Raleigh et al., Nucl. Acid Res. 16, 1563-1575 (1988)] létesítettek. Másrészt Börman és munkatársai [Mol. Microbiol. 6(3), 317-326] leírnak egy *C. glutamicum* ATCC 13032 génbankot a pHc79 kozmid [Hohn and Collins, Gene 11, 291-298 (1980)] alkalmazásával.

C. glutamicum génbank létrehozásához *E. coli*-ban plazmidok illetve plazmidvektorok – például pBR322 [Bolivar, Life Sci. 25, 807-818 (1979)], pUC9 [Vieira et al., Gene 19, 259-268 (1982)], pACYC177 [Chang and Cohen, J. Bacteriol. 134, 1141-1156 (1978)] vagy pSC101 [Cohen and Chang, J. Bacteriol. 132, 734-737 (1977)] – is felhasználhatók. Gazdaszervezetként különösen megfelelőek restrikció- és rekombináció-hibás *E. coli* törzsek.

A génbankot ezt követően transzformációval [Hanahan, J. Mol.

Biol. 166, 557-580] vagy elektroporációval [Tauch et al., FEMS Microbiol. Lett. 123, 343-347 (1994)] egy indikátor törzsbe építjük be. Az indikátor törzs azáltal tűnik ki, hogy a szóban forgó génen olyan mutációt tartalmaz, amely detektálható fenotípust eredményez. A találmány keretei között a Goldie és Sanwal által leírt [J. Bacteriol. 141, 1115-1121 (1980)] *E. coli* HG4 mutánsnak van jelentősége. Ez a törzs olyan mutációt hordoz a *pck* génben, amelynek következtében a szukcináton, mint egyedüli szénforráson való növekedés erősen korlátozott. *pck* gént tartalmazó vektorral történő transzformációval a szukcináton való növekedés újra visszaállítható.

Kozmidok vagy más vektorok segítségével klónozott hosszú DNS fragmentumok azután rövidebb DNS fragmentumok formájában ismert plazmidvektorokba szubklónozhatók. Ily módon válik lehetővé a találmány szerinti gén hozzárendelése egy specifikus DNS szakaszhoz. Ehhez a technika mai körülményei között ismert plazmidvektorokat alkalmazunk, mint például a pBR322 vektort [Bolivar, Life Sci. 25, 807-818 (1979)] vagy a Bartolomé és munkatársai által leírt pSU vektorokat [Gene 102, 75-78 (1991)]. Azonban előnyösen olyan ingavektorokat alkalmazunk, amelyek *Escherichia coli*-ban és *Corynebacterium glutamicum*-ban egyaránt replikálódnak - mint például a pZ1 vektort [Menkel et al., Appl. Environ. Microbiol. 64, 549-554 (1989)] vagy pEK0 vektort [Eikmans et al., Gene 102, 93-98 (1991)] -, hogy mindkét fajban tudjunk vizsgálatokat végezni. Erre példák a pEK-pckA (1. ábra) és pEK-pckB (2. ábra) plazmidok, amelyeket a pEK0 plazmidvektorból kiindulva állítottunk elő és hordozzák a talál-



mány szerinti pck gént.

Az ily módon jellemzett DNS szakaszokat azután ismét a jelenleg használatos, a DNS szekvenáláshoz alkalmas vektorokba szubklónozzuk. Másik lehetőségként a hosszú, kozmidokba klónozott DNS szakaszok közvetlenül szekvenáló vektorokba szubklónozzhatók. Példák ilyen DNS szekvenáláshoz alkalmas vektorokra a pGEM-5zf(-) vagy pGEM-5zf(+) plazmidok (Promega Corp., Madison, WI, USA) [Promega Protocols and Application Guide, 2nd ed. 1981 (1991)].

DNS szekvenálási módszereket írnak le többek között Sanger és munkatársai [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467 (1977)].

A kapott DNS szekvenciák azután ismert algoritmusokkal illetve szekvencia analizáló programokkal, mint például a Staden által leírttal [Nucl. Acids Res. 14, 217-232 (1986)], a Butler szerinti GCG programmal [Methods Biochem. Anal. 39, 74-79 (1998)], a Pearson és Lipman féle FASTA algoritmussal [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444-2448 (1988)] vagy az Altschul és munkatársai által leírt BLAST algoritmussal [Nature Genet. 6, 119-129 (1994)] vizsgálhatók és a nyilvánosan hozzáférhető adatbankokban előforduló szekvenciákkal összehasonlíthatók. Nyilvánosan hozzáférhető nukleotid-szekvencia adatbankok például az Európai Molekuláris Biológiai Laboratórium (European Molecular Biology Laboratories = EMBL, Heidelberg, Deutschland) vagy az amerikai Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ (National Center for Biotechnology Information = NCBI, Bethesda, MD, USA).

Ily módon kaptuk meg az új, pck gént kódoló DNS szekvenciát *C. glutamicum*-ból, amely 1. számú szekvenciaként a találmány ré-



szét képezi. Továbbá a rendelkezésre álló DNS szekvenciából a fent leírt módszerekkel levezettük a megfelelő fehérje aminosav-szekvenciáját. A 2. számú szekvenciában mutatjuk be a pck gén-termék így adódott aminosav-szekvenciáját.

Az 1. számú szekvenciából a genetikai kód degeneráltsága révén adódó kódoló szekvenciák szintén a találmány oltalmi körébe tartoznak. Hasonlóképpen a találmány részét képezik olyan DNS szekvenciák, amelyek az 1. számú szekvenciával vagy az 1. számú szekvencia részeivel hibridizálnak. Végül a találmány oltalmi körébe tartoznak olyan DNS szekvenciák, amelyeket az 1. számú szekvenciából adódó primerek alkalmazásával polimeráz láncreakcióval (PCR-rel) állítunk elő. Ilyen oligonukleotidok jellemzően legalább 15 bázispár hosszúságúak.

Útbaigazítást DNS szekvenciák hibridizációval történő azonosítására többek között a következő kézikönyvben [The DIG System Users Guide for Filter Hybridization, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland (1993)] és Liebl és munkatársai leírásában [Int. J. System. Bacteriol. 41, 255-260 (1991)] talál a szakember. DNS szekvenciák polimeráz láncreakcióval (PCR-rel) történő megsokszorozására (amplifikálására) leírást találunk többek között Gait kézikönyvében [Oligonukleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford, UK (1984)] és Newton and Graham könyvében [PCR, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland (1994)].

A feltalálók kiderítették, hogy coryneform baktériumok a pck gén legyengítése után jobban termelnek L-aminosavakat, különösen lizint és treonint.

A legyengítés elérése céljából csökkenthető illetve kikapcsolható a pck gén kifejeződése vagy az enzimfehérje katalitikus tulajdonságai. Adott esetben a kettő kombinálható egymással.

A génkifejeződés csökkentése elérhető a tenyésztés megfelelő vezetésével vagy a génkifejeződés szignál struktúrájának genetikai megváltoztatásával (mutációval). A génkifejeződés szignál struktúrái például a represszor gének, aktivátor gének, operátorok, promóterek, attenuátorok, riboszómakötő-helyek, a start kódon és terminátorok. Ezekhez leírást talál a szakember például a WO 96/15246 számon közzétett nemzetközi szabadalmi bejelentésben és az alábbi hivatkozásokban [Boyd and Murphy, J. Bacteriol. 170, 5949 (1988); Voskuil and Chambliss, Nucl. Acids Res. 26, 3548 (1998); Jensen and Hammer, Biotechnol. Bioeng. 58, 191 (1998); Patek et al., Microbiol. 142, 1297 (1996)] és ismert genetikai és molekuláris biológiai tankönyvekben, mint például Knippers, Molekulare Genetik 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland (1995) vagy Winnacker, Gene und Klone, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland (1990).

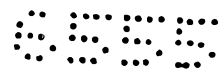
Olyan mutációk, amelyek enzimfehérjék katalitikus tulajdonságainak megváltozásához illetve csökkenéséhez vezetnek, ismertek a szakmában; példaként megemlíthetők az alábbiak munkái [Qiu és Goodman, J. Biol. Chem. 272, 8611-8617 (1997); Sugimoto et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 61, 1760-1762 (1997) és Möckel, Die Threonindehydratase aus *Corynebacterium glutamicum*: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms, Berichte des Forschungszentrums Jülichs, Deutschland (1994)]. Összefoglaló ismertetések hozzáférhetők ismert genetikai és mo-



lekuláris biológiai tankönyvekben, mint például Hagemann, Allgemeine Genetik, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1986).

Mutációként tranzíciók, transzverziók, inszerciók és deléciók jönnek számításba. Az aminosav cseréknek az enzimaktivitásra gyakorolt hatásával összefüggésben mis-szenz mutációkról vagy nem szenz mutációkról beszélünk. Egy génben legalább egy bázispár inszerciója vagy deléciója keret eltolásos mutációhoz (frame shift mutation) vezet, amelynek következtében rossz aminosav épül be vagy a transzláció idő előtt megszakad. Több kódon deléciója jellemző módon az enzimaktivitás teljes elvesztését eredményezi. Ilyen típusú mutációk létrehozására szolgáló leírások ismertek a szakmában és genetikai és molekuláris biológiai tankönyvekben hozzáférhetők [Knippers, Molekulare Genetik 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland (1995); Winnacker, Gene und Klone, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland (1990) vagy Hagemann, Allgemeine Genetik, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1986)].

Mutációt szenvedett pck génre egy példa a pK19mobsacB Δ pck plazmidban (3. ábra) található Δ pck-allél. A Δ pck-allél a pck génnek csupán az 5' - és 3' -szegélyeit tartalmazza, a kódoló régióból hiányzik (deléció) egy 1071 bp hosszúságú szakasz. Ez a Δ pck-allél integrációs mutagenézissel beépíthető coryneform baktériumokba. Ehhez a fent említett pK19mobsacB Δ pck plazmidot vesszük igénybe, amely *C. glutamicum*-ban nem képes replikálódni. Konjugációval vagy transzformációval történő átvitel és egy első, integrációt okozó „cross-over esemény” és egy második, kivágást eredményező „cross-over esemény” segítségével végzett ho-



mológ rekombináció után megvalósul a Δpck -allél beépülése a pck génbe és az adott törzsből az enzim működésének teljes elvesztését érjük el.

Az integrációs mutagenézisre leírásokat és magyarázatokat találunk például az alábbi hivatkozásokban [Schwarzer and Pühler, *Bio/Technol.* 9, 84-87 (1991) vagy Peters-Wendisch et al., *Microbiol.* 144, 915-927 (1998)].

Példák aminosav termelő coryneform baktérium törzsekre, amelyek legyengített pck gént tartalmaznak, a lizint termelő MH20-22 Δpck és a treonint termelő DM368-2 Δpck törzsek.

L-aminosavak termeléséhez kiegészítésként előnyös lehet még a pck gén legyengítése mellett a mindenkori bioszintézis útvonal egy vagy több enzimjének túlzott kifejezése.

Így például L-lizin előállításához

- egyidejűleg a dihidro-dipikolinát szintetázt kódoló $dapA$ gén túlzott kifejezése (EP-B 0 197 335) vagy
- egyidejűleg egy S-(2-aminoetil)-cisztein rezisztenciát közvetítő DNS fragmentum megsokszorozása (EP-A 0 088 166).

Így például L-treonin előállításához

- egyidejűleg a homoszerin-dehidrogenázt kódoló hom gén [Peoples et al., *Mol. Microbiol.* 2, 63-72 (1988)] vagy egy „feed back rezisztens” homoszerin-dehidrogenázt kódoló hom^{dr} illetve hom_{FBR} allél [Archer et al., *Gene* 107, 53-59 (1991); Reinscheid et al., *J. Bacteriol.* 173, 3228-3230 (1991)] túlzott kifejezése.

Továbbá L-aminosavak, különösen lizin és treonin termeléséhez a pck gén legyengítése mellett előnyös lehet nemkívánatos mellékreakciók kikapcsolása [Nakayama, *Breeding of Amino Acid*

Producing Microorganisms, in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK (1982)] .

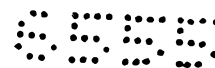
A találmány szerint előállított mikroorganizmusok L-aminosavak, különösen L-lizin és L-treonin előállítása céljából szaporíthatók folyamatosan vagy szakaszosan batch fermentációs eljárással (Satzkultivierung) vagy fed batch eljárással (Zulaufverfahren) vagy ismételt fed batch eljárással (repetitives Zulaufverfahren). Ismert tenyésztési eljárásokról összefoglalás található az alábbi tankönyvekben [Chmiel, Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1991) vagy Storhas, Bioreaktoren und periphere Einrichtungen, Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden (1994)] .

Az alkalmazott tápoldatnak a mindenkori törzs igényeit kell alkalmas módon kielégítenie. Különböző mikroorganizmusok számára szaporító tápoldatok leírását tartalmazza az alábbi kézikönyv [Manual of Methods for General Bacteriology, American Society for Bacteriology, Washington D.C., USA (1981)] . Szénforrásként alkalmazható cukor és szénhidrát, mint például glükóz, szacharóz, laktóz, fruktóz, maltóz, melasz, keményítő és cellulóz, olajok és zsírok, mint például szójaolaj, napraforgóolaj, földimogyoró-olaj és kókuszszsír, zsírsavak, mint például palmitinsav, sztearinsav és linolsav, alkoholok, mint például glicerín és etanol és szerves savak, mint például ecetsav. Ezek az anyagok felhasználhatók egyedül vagy keverék formájában. Nitrogénforrásként felhasználhatók szerves nitrogént tartalmazó vegyületek, mint pepton, élesztőkivonat, húskivonat, malátakivonat, kukori-

calekvár, szójaliszt és karbamid vagy szervesetlen vegyületek, mint ammónium-szulfát, ammónium-klorid, ammónium-foszfát, ammónium-karbonát és ammónium-nitrát. A nitrogénforrások felhasználhatók egyedül vagy keverék formájában. Foszforforrásként alkalmazható foszforsav, kálium-dihidrogénfoszfát vagy dikálium-hidrogénfoszfát vagy a megfelelő nátrium tartalmú sók. A tápoldatnak tartalmaznia kell továbbá fémsókat, mint például magnézium-szulfátot vagy vas-szulfátot, amelyek szükségesek a növekedéshez. Végül a fent nevezett anyagok kiegészíthetők létfontosságú növekedést serkentő anyagokkal, mint aminosavakkal és vitaminokkal. A tápoldathoz ezenfelül megfelelő oltóanyagot adhatunk. A nevezett kiegészítő anyagok hozzáadhatók a tenyészethez egyszeri adagban vagy a szaporítás során megfelelően adagolva.

A tenyészet pH kontrolljához alkalmas módon adagolhatók bázikus vegyületek, mint nátrium-hidroxid, kálium-hidroxid, ammónia illetve ammónium-hidroxid vagy savas vegyületek, mint foszforsav vagy kénsav. A habképződés kontrollja céljából adagolható habzásgátló, mint például zsírsav-poliglikolészter. Plazmidok stabilitásának fenntartásához megfelelő szelektíven ható anyagok, például antibiotikumok adagolhatók a tápoldathoz. Az aerob viszonyok fenntartásához oxigént vagy oxigént tartalmazó gázkeveréket, mint például levegőt vezetünk a tenyészetbe. A tenyészet hőmérséklete normális körülmények között 20-45 °C között, előnyösen 25-40 °C között van. A tenyésztést annyi ideig folytatjuk, amíg a kívánt L-aminosav maximuma megtermelődik. Ezt a célt normális esetben 10-160 óra között érjük el.

A következő mikroorganizmust helyeztük letétbe a budapesti



szerződésnek megfelelően a német mikroorganizmusok és sejtkultúrák gyűjteményében (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen = DSMZ, Braunschweig, Deutschland) a DSM 13047 letéti számon:

- *Escherichia coli* DH5 α /pK19mobsac Δ pck

A találmány szerinti eljárás L-aminosavak, különösen L-aszparaginsav, L-aszparagin, L-homoszerin, L-treonin, L-izoleucin és L-metionin fermentatív előállítását szolgálja coryneform baktériumok segítségével, különösen L-lizin és L-treonin előállítását.

Példák

A találmányt a következő kiviteli példákkal világítjuk meg közelebbről.

Ebből a célból többek között kísérleteket végeztünk a lizin-termelő *Corynebacterium glutamicum* MH20-22B és a treonintermelő *Brevibacterium flavum* DM368-2 törzsekkel. Az MH20-22B törzset a DSM 5715 letéti számon (EP-B-0435 132) és a DM368-2 törzset a DSM 5399 letéti számon (EP-B-0385 940) helyeztük letétbe a budapesti szerződésnek megfelelően a német mikroorganizmusok és sejtkultúrák gyűjteményében (DSMZ, Braunschweig, Deutschland).

1. példa

A pck gén izolálása

A PEP-karboxipeptidáz gén (pck) *C. glutamicum*-ból történő izolálásához a pH79 kozmidra [Hohn and Collins, Gene 11, 291-298 (1980)] alapozva, ismert módszer szerint [Sambrook et al., Molecular cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor

Laboratory Press (1989)] kozmid génbankot hoztunk létre. Ehhez a *C. glutamicum* ATCC 13032 törzsből kromoszómális DNS-t izoláltunk [Eikmanns et al., Microbiol. 140, 1817-1828 (1994)] és *Sau3A* restrikciós enzimmel részlegesen emésztettük. A kapott fragmentumoknak a pHC79 kozmid *Bam*HI hasítási helyére történő ligációját követően ezt az összetételt lambda bakteriofág fehérjeburkába csomagoltuk és az *E. coli* ED8654 törzset [Murray et al., Mol. Gen. Genetics 150, 53-61 (1997)] ezzel transzformáltuk. A rekombináns kozmidnak a lambda fág fehérjeburkába történő becsomagolása Sternberg és munkatársai módszere [Gene 1, 255-280 (1979)] szerint történt, az *E. coli* ED8654 törzset Sambrook és munkatársai módszere szerint [Molecular cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))] végeztük el. Az így kapott összesen 30 rekombináns *E. coli* klón közül izoláltuk a megfelelő kozmidokat [Sambrook et al., Molecular cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))] és *Hind*III restrikciós enzimmel restrikciós analízisnek vetettük alá. Azt találtuk, hogy a vizsgált kozmidok közül 24 inszertumot tartalmazott, és az inszertumok nagysága körülbelül 35 kb volt. Összesen 2200 kozmidot hordozó *E. coli* klónt egyesítettünk és ebből a keverékből ismert eljárással [Sambrook et al., Molecular cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))] kinyertük a kozmid DNS-t.

A pck génnek *C. glutamicum*-ból történő izolálásához a kozmid génbankot a PEP-karboxikináz hiányos *E. coli* HG4 mutánsba [Goldie and Sanwal, J. Bacteriol. 141, 1115-1121 (1980)] ismert eljárással [Sambrook et al., Molecular cloning, A Laboratory

Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] transzformáltuk. A HG4 mutáns PEP-karboxikináz hiánya folytán már nem tudja a szukcinátot, mint egyedüli szénforrást hasznosítani. A kozmid génbanknak ebbe a mutánsba történő transzformációját követően összesen 1200 klónt kaptunk. Ezek közül összesen két klón mutatott növekedést M9 minimál táptalajon [Sambrook et al., Molecular cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)], amely egyedüli szénforrásként szukcinátot (0,4%-ot) tartalmazott. A megfelelő kozmidoknak ezekből a klónokból történt izolálása [Sambrook et al., Molecular cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] és az *E. coli* HG4 mutánsba való ismételt transzformációja után az eredményül kapott klónok újból képesek voltak az egyedüli szénforrásként szukcinátot tartalmazó M9 táptalajon való növekedésre.

A *C. glutamicum*-ból származó pck génnek egy kisebb fragmentumra történő behatárolásához a két komplementer kozmidot *Xho*I, *Sca*I és *Pvu*II restrikciós enzimekkel emésztettük és ismert módszerrel [Sambrook et al., Molecular cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] 0,8%-os agaróz gélen elektroforézissel felbontottuk. A 3,0 kb nagyság fölötti fragmentumokat elektroelúcióval [Sambrook et al., Molecular cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] izoláltuk a gélből és a pEK0 vektor [Eikmans et al., Gene 102, 93-98 (1991)] *Sal*I (*Xho*I-emésztés) illetve a Klenow-val kezelt *Eco*RI hasítási helyére (*Sca*I- és *Pvu*II-emésztés) ligáltuk. A ligációs tételekkel *E. coli* HG4 törzset transzformáltunk és a

kapott transzformátumokat újból azon képesséjükre vizsgáltuk, képesek-e egyedüli szénforrásként szukcinátot tartalmazó tápközegekben növekedni. A *pvuII* ligációs tétellel készült transzformációs összetételben hét olyan klón mutatkozott, amelyeknek a plazmidja lehetővé tette a HG4 mutáns növekedését szukcináton. A rekombináns törzsekből izoláltuk a megfelelő plazmidokat és restriktációs térképezésnek vetettük alá azokat. Azt találtuk, hogy mind a hét plazmid ugyanazt a 4,3 kb nagyságú *PvuII* inszertumot hordozta, három egy irányban és négy a másik irányban. Attól függően, hogy az inszertumok milyen irányban helyezkedtek el a vektorban, az újonnan összeállított plazmidokat pEK-pckA és pEK-pckB jelöléssel láttuk el. Mindkét plazmid restriktációs térképét bemutatjuk az 1. és 2. ábrán.

2. példa

A pck struktúrgén és azzal határos területek szekvenálása

A szekvenáláshoz a pEK-pckA plazmidból származó körülbelül 3,9 kb nagyságú *EcoRI*-fragmentumot (ebben a pEK0 vektorból származik egy *EcoRI* hasítási hely) ismert módszerrel izoláltuk. A fragmentum kiugró végeit Klenow-polimerázzal síma végekké töltöttük fel [Sambrook et al., Molecular cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))] és a pGEM-5Zf(+) vektor (Promega Corp., Madison, WI, USA) *EcoRV* hasítási helyére ligáltuk. Az így létrehozott plazmid inszercióját a Sanger és munkatársai által leírt lánchasító szekvenáló módszerrel [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467 (1977)] szekvenáltuk. A kapott 3935 bp nukleotid-szekvenciát a német rákkutató központ (Deutsches Krebsforschungszentrum, DKFZ, Heidelberg,

Deutschland) HUSAR programcsomagjával analizáltuk. A fragmentum szekvencia analízise egy 1830 bp hosszúságú nyílt leolvasási keretet eredményezett, amely 610 aminosavból álló fehérjét kódol.

3. példa

A pck gén túlzott kifejezése

A pEK-pckA és pEK-pckB plazmidokat elektroporációval – amelyet kanamicint (50 µg/ml-t) tartalmazó BHI agarlemezeken végzett szelekció követett [Liebl et al., FEMS Microbiol. Lett. 65, 299-304 (1989)] – juttattuk be a *C. glutamicum* ATCC 13032 törzsbe és az eredményül kapott törzseket ATCC 13032/pEK-pckA és ATCC 13032/pEK-pckB jelölésekkel láttuk el. Ezt a két törzset és a kiindulási törzset Luria-Bertani-féle komplex táptalajon [Sambrook et al., Molecular cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] tenyésztettük és elvégeztük a Bentele és Lardy módszere szerinti [J. Biol. Chem. 251, 2916-2921 (1976)] PEP-karboxikináz tesztet. Az analízis eredményét az 1. táblázatban mutatjuk be, amely azt mutatja, hogy mindkét, a pEK-pckA illetve pEK-pckB plazmidokat tartalmazó törzs PEP-karboxikináz aktivitása 10-12-szer nagyobb, mint a kiindulási törzsé.

1. táblázat

PEP-karboxikináz aktivitás különböző törzsekben

Törzs	PEP-karboxikináz (nmól/perc, mg fehérje)
ATCC 13032	120
ATCC 13032/pEK-pckA	1270
ATCC 13032/pEK-pckB	1510

4. példa

Integrációs plazmid előállítás a pck gén deléció mutageneziséhez

A PEP-karboxikináz gén inaktiválása céljából a pEK-pckB vektorból (2. ábra) a pck gén *EcoRI*-*SacI* fragmentumát izoláltuk és a pGEM-7Zf(+) (Promega Corp., Madison, WI, USA) vektorba ligáltuk. Az eredményül kapott plazmidból egy pck-belső 1,07 kb *HindII*-*HindIII* fragmentumot deletáltunk, ezután az 1,07 kb deléciót tartalmazó pck gént *BfrI*-*SacI* fragmentumként izoláltuk és a kiugró végek feltöltése után a *C. glutamicum*-ban nem replikálódó pK19mobsacB vektorba [Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)] ligáltuk. Az így összeállított pK19mobsacB Δ pck integrációs plazmidban (3. ábra) a pck gén 5'-területe (350 bp) közvetlenül határolja a pck gén 3'-területét (340 bp); a genomban a két területet 1071 bp választja el egymástól. Eddig a lépésig minden klónozást *E. coli* DH5 α gazdaszervezetben végeztünk el.

5. példa

A pck gén deléció mutagenezise a lizint termelő MH20-22B törzsben

A pK19mobsacB Δ pck integrációs plazmiddal azután *E. coli* S17-1 törzset transzformáltunk [Simon et al., Bio/Techn. 1, 784-791 (1983)]. Ez a törzs lehetővé teszi plazmid átvitelét *Corynebacterium glutamicum*-ba konjugációval [Schäfer et al., J. Bacteriol. 172, 1663-1666 (1990)]. A konjugáció recipienseként a lizint termelő *C. glutamicum* MH20-22B törzset alkalmaztuk [Schrumpf et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 37, 566-571 (1992)]. Az *E. coli* S17-1/pK19mobsacB Δ pck és *C. glutamicum* MH20-



22B konjugációjából és azt követő, kanamicinnel (25 µg/ml) és nalidixsavval (50 µg/ml) kiegészített Luria-Bertani-féle agar-lemezeken történő szelekcióval több transzkonjugátumot kaptunk. A második rekombinációs eseményhez – amelynek a pck génnel rendelkező vektor kivágásához kell vezetnie – történő kiválasztáshoz ezeket a transzkonjugátumokat antibiotikum mentes, 1% glükózt tartalmazó Luria-Bertani-féle komplex táptalajon [Sambrook et al., Molecular cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))] tenyésztettük és azután ugyanezen táptalaj 10% szacharózzal kiegészített változatára szélesztettük. A pK19mobsacB vektoron előforduló sacB gén kódolja a leván szacharáz enzimet és szacharózból leván szintéziséhez vezet. Mivel a leván *C. glutamicum* számára toxikus, csak azok a *C. glutamicum* sejtek képesek szacharózt tartalmazó táptalajon növekedni, amelyek az integrációs plazmidot elvesztették [Jäger et al., J. Bacteriol. 174, 5462-5466 (1992)]. 30 szacharóz rezisztens klónt vizsgáltunk át kanamicin érzékenységre nézve. A megvizsgált klónok közül 11-nél lehetett szacharóz rezisztenciájuk mellett kívánt kanamicin érzékenységet is bizonyítani. Ebben a 11 klónban a vektor háttérrel tehát ismét kivágtuk. Annak megállapítását, vajon a kívánt deléció is megtörtént-e, polimeráz láncreakcióval (PCR-rel) végzett analízissel vizsgáltuk meg. Ennek érdekében a kiindulási törzs telepéből és a 11 kanamicinre érzékeny klón telepeiből kromoszómális DNS-t tettünk szabaddá. Ehhez a mindenkori telepet fogpiszkálóval leemeltük az agar-lemezről, 50 µl vízben elszuszpendáltuk és 5 percig 95 °C-on inkubáltuk. A kapott oldat 1 µl-ét templátként vittük be a PCR-



hez. Primerként olyan oligonukleotidokat használtunk, amelyek az 1. számú szekvencia 2136-2158. és 3815-3793. nukleotidjai közötti területeket lefedik. A PCR körülményei a következők voltak: elődenaturálás 150 másodpercig 94 °C-on; denaturálás 60 másodpercig 94 °C-on; hibridizáció 30 másodpercig 60 °C-on; megsokszorozás (amplifikáció) 120 másodpercig 72 °C-on; 30 ciklus, végek kiterjesztése (end-extension) 240 másodpercig 72 °C-on. A kiindulási törzs DNS-ét tartalmazó összetételben a kiválasztott primerek alapján 1,68 kb PCR terméket vártunk. A pck deléciós mutáns PCR termékeként 0,61 kb terméket vártunk. Egy klónnál kaptunk 0,61 kb nagyságú PCR terméket. Ezáltal bizonyítást nyert a belső 1071 bp nagyságú pck fragmentum kívánt deléciója ennél a klónnál. A klónt MH20-22B Δ pck jelzéssel láttuk el. A hátralevő klónok összetételeiben kimutattuk az 1,68 kb PCR terméket. Ezekben tehát a vektor úgy lett kivágva, hogy a genomiális kiindulási helyzet újra helyreállítódott.

Az MH20-22B Δ pck és az MH20-22B kiindulási törzset 1% glükózt tartalmazó Luria-Bertani-féle komplex tápoldatban elszaporítottuk és elvégeztük a PEP-karboxikináz tesztet a Bentle és Lardy által leírt módszer [J. Biol. Chem. 251, 2916-2921 (1976)] szerint. Az analízis eredménye (2. táblázat) azt mutatja, hogy az MH20-22B kiindulási törzzsel ellentétben az MH20-22B Δ pck mutánsban már nem mutatható ki PEP-karboxikináz aktivitás.



2. táblázat

PEP-karboxikináz aktivitás különböző törzsekben

Törzs	PEP-karboxikináz (nmól/perc, mg fehérje)
MH20-22B	65
MH20-22B Δ pck	< 3*

*3 nmól/perc, mg fehérje a kimutatási határ

6. példa

L-lizin előállítás

A PEP-karboxikináz gén inaktiválásának lizintermelésre gyakorolt hatását vizsgálándó az MH20-22B törzset [Schrumpf et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 37, 566-571 (1992)] valamint a PEP-karboxikináz negatív mutáns MH20-22B Δ pck törzset (5. példa) 1% glükózt tartalmazó Luria-Bertani-féle komplex tápoldatban elszaporítottuk és mindkét tenyészetet egy-egy CGXII fermentációs tápoldatot [Keilhauer et al., J. Bacteriol. 175, 5595-5603 (1993)] oltottunk be (5% inokulum, optikai denzitás 600 nm-en körülbelül 0,5). A tápoldat kiegészítésként 3 mM leucint tartalmazott, mivel mindkét törzs leucin auxotróf. Az összetételek egyenként 60 ml tenyészetből álltak, amelyeket 500 ml-es Erlenmeyer lombikokban rázattunk. 24 órán át 28 °C-on, Certomat S/50 típusú rotációs rázógépen (Braun, Biotech International, Melsungen, Deutschland) 120 perc/fordulat mellett történt szaporítás után meghatároztuk a tápoldatba kiválasztott lizin koncentrációját.

Az aminosav koncentrációt nagynyomású folyadékkromatográfiával (HPLC-vel) határoztuk meg [Jones and Gilligan, J. Chrom.

266, 471-482 (1983)]. A fermentáció eredménye a 3. táblázatban olvasható.

3. táblázat

Lizin koncentráció az MH20-22B és MH20-22B Δ pck törzsek tenyésztének felülúszójában

Törzs	L-lizin (mM)
MH20-22B	54
MH20-22B Δ pck	65

7. példa

A pck gén deléciós mutagenézise a treonint termelő DM368-2 törzsben

Ugyanúgy, mint a lizint termelő MH20-22B törzs esetében, elvégeztük az *E. coli* S17-1/pK19mobsacB Δ pck és a treonint termelő DM368-2 konjugációját, amelyet az első és második rekombinációra történő szelekció követett (lásd az 5. példát). 30 szacharóz rezisztens klónból 14 volt kanamicinre érzékeny. Ezek közül kettőben, a DM368-2 Δ pck16 és DM368-2 Δ pck18 jelzéssel ellátott klónokban tudtuk kimutatni – az 5. példában leírt PCR analízis segítségével – a 1071 bp deléciót a pck génben.

A DM368-2 kiindulási törzsszel és a két – DM368-2 Δ pck16 és DM368-2 Δ pck18 – pck deléciós törzsszel az 5. példában leírtak szerint elvégzett enzim teszt azt mutatta, hogy ezekben a mutánsokban nem mutatható ki PEP-karboxikináz aktivitás (4. táblázat).

4. táblázat

PEP-karboxikináz aktivitás különböző törzsekben

Törzs	PEP-karboxikináz (nmól/perc, mg fehérje)
DM368-2	79
DM368-2 Δ pck16	< 3*
DM368-2 Δ pck18	< 3*

*3 nmól/perc, mg fehérje a kimutatási határ

8. példa

L-treonin előállítás

A lizin előállítására végzett kísérletekhez hasonlóan összehasonlítottuk a treonin akkumulációt a PEP-karboxikináz hiányos DM368-2 Δ pck16 törzs és a kiindulási DM368-2 törzs tenyészetének felülúszójában. Ehhez mindkét törzset elszaporítottuk 1% glükózt tartalmazó Luria-Bertani-féle komplex táptalajon és ezekkel az inokulumokkal egy-egy CGXII fermentációs tápoldatot oltottunk be. 24 órán át 28 °C-on, rotációs rázógépen 120 perc/fordulat mellett történt szaporítás után meghatároztuk a tápoldatba kiválasztott treonin koncentrációját.

Az aminosav koncentrációt nagynyomású folyadékkromatográfiával (HPLC-vel) határoztuk meg (lásd fent). A fermentáció eredménye az 5. táblázatban olvasható.

5. táblázat

Treonin koncentráció a DM368-2 és DM368-2 Δ pck16 törzsek tenyészetének felülúszójában

Törzs	L-treonin (mM)
DM368-2	8
DM368-2 Δ pck16	22

Az ábrák leírása

- 1. ábra: a pEK-pckA plazmid restrikciós térképe
- 2. ábra: a pEK-pckB plazmid restrikciós térképe
- 3. ábra: a pK19mobsacBΔpck plazmid restrikciós térképe

A bázispárok számának megadásánál körülbelüli értékek szerepelnek, amelyek a reprodukálhatóság határán belül maradnak.

Az alkalmazott rövidítések és jelölések jelentése:

sacB: sacB gén

ori V: V replikációs origó

ori T: a transzfer replikációs origója

Km-r: kanamicin rezisztencia

KpnI: a *KpnI* restrikciós enzim hasítási helye

HindIII: a *HindIII* restrikciós enzim hasítási helye

HindII: a *HindII* restrikciós enzim hasítási helye

PstI: a *PstI* restrikciós enzim hasítási helye

SphI: az *SphI* restrikciós enzim hasítási helye

XbaI: az *XbaI* restrikciós enzim hasítási helye

SalI: a *SalI* restrikciós enzim hasítási helye

SacI: a *SacI* restrikciós enzim hasítási helye

BfrI: a *BfrI* restrikciós enzim hasítási helye

ScaI: az *ScaI* restrikciós enzim hasítási helye

BamHI: a *BamHI* restrikciós enzim hasítási helye

EcoRI: az *EcoRI* restrikciós enzim hasítási helye

pck' : a pck gén 3' -terminális fragmentuma

pck'' : a pck gén 5' -terminális fragmentuma

pck: pck gén



Szekvenciák jegyzéke

AZ 1. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

- (A) HOSSZ: 3935 bázispár
(B) TÍPUS: DNS

(vi) EREDETI FORRÁS:

- (A) SZERVEZET: *Corynebacterium glutamicum*

(ix) JELLEMZŐK:

- (A) NÉV/KULCS: CDS
(B) ELHELYEZKEDÉS: 2022..3851

(xi) AZ 1. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

```

ctggcagttc tcctaattga tcgcgggaat tatcagaaat agacattatt tgttattttt 60
cctgttcaac tttaaaactt caatattcgt gagtttggat gaatccctag agcactacct 120
30 tttagacctc tcgctgcaat ttaggccagt tgagatttaa gctttccgac gattcttctc 180
attactgcaa tcgtaccggc gatggtggac acgatgacat gaaagagcat taaagcaatc 240
35 aagtacaggc tgaagtagtt aaaccactcc actccggtgc tctgtgataa aaaatgcgca 300
cccaaactca aagtgccaac tgggaaggta ctggcccacc atgtggggct gtatgtcgcc 360
cctttgaaaa cagctctgta gaacacaaag tgagcgatgg ctcccagagg aatcgtaaaa 420
40 attcccatga tgatgccgta aataatgcc attgtgattg ctgtcttggg tccaaaggac 480
gcaccgatga gctgagctgc tgcagtggat tggccaccca taccaaagg aatccatgat 540
45 gttggtgttg ccatcagtgg gatgccctgc gccttggggc cgaaatagta gaaatacact 600
cgggtaaaaa ctgctggtgc agacgcaaaa gttaaaagga agagcccgaa agaaaccac 660
agcatcgccg gaagttcaaa gtgctcatgg agttgtgctg ccgaggtgga agcaaccatc 720
50 ggcgtgacaa gaggaagacc ccacgcaaaa gttggtgtgc ccgccttaga tcgcaaaatg 780
gccgttatat ataaggaata ggcaacaagt ccacggctg tgccaataga ccagcacaca 840
55 aacataaatc ccacagatc atcaccaaaa actacggggc ttgcagttcc caatgcgac 900
aaacccatgg acagcattgc ccatgccggc atgacttcag ttttgaatga aggagagcgg 960
tagattagcc aaccgccaat aatgacaatt gccaccacaa cagctaacgc gaagaagaaa 1020

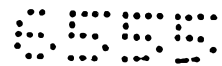
```



tctgcgacga ctggaaaacc atggattttc aacagtgatg acaacaatga gatgcccattg 1080
 5 aggggaaccag cccacgaggg gccaggtgga ggtaagaccg cagcgtagct tttggtcgaa 1140
 gaaggagtgg gcatgcccatt tactttaagc ctttggggca gtgaaaccgc taaatgggag 1200
 cggtgtgcgc tcgatcactg gtctagacct ttggggtcca aaagttgcaa tttcgcgaat 1260
 10 acttcaacac ttgtttgcaa tgtttgttaa taaatgggtt cgctagtggg ttctgtcggt 1320
 agtactggcc gtcgtggtgg ggtcatgtat ttaggtaggg caaagttaag atcagagcac 1380
 15 tttttgatac gactaactgg atataacctt tggggtaacg tggggatgtg tgtgagtaat 1440
 tttcaaagta tttaaaaggg ggatctaggg taaaaatttg gtttcaagta catatcttta 1500
 gttcggtagt tgagggcggg tgggtgacagt gcgggcatgc atgtgagtgt aaatgttggt 1560
 20 ttaaaaagggt gtgtactgac agtgggcccgg tttgtgctgg tcggccacta gcggagtgtc 1620
 tggattgtga tggcagggta agggaaaggg attaccatta ccgctgttct tggcgttttg 1680
 ttgcctattg tccgaatgtt aagtgttaat ggtgggaaaa ctgggaaagt tgtcccctgg 1740
 25 aatgtgtgag aattgcccga atctgaacct aatggccatg gacggggaat gaactgtcgg 1800
 agaacggttg aggttaattc ttgaaaccac ccccaaaata ggctatttaa acgggtgctc 1860
 30 tcatattaaa gaaagtgtgt agatgcgtgt gggcaggggg taggtccact ggtaatgaca 1920
 aatgtgtccg ttgtctcacc taaagtttta actagttctg tatctgaaag ctacgctagg 1980
 gggcgagaac tctgtcgaat gacacaaaat ctggagaagt a atg act act gct gca 2036
 35 Met Thr Thr Ala Ala
 1 5
 atc agg ggc ctt cag ggc gag gcg ccg acc aag aat aag gaa ctg ctg 2084
 40 Ile Arg Gly Leu Gln Gly Glu Ala Pro Thr Lys Asn Lys Glu Leu Leu
 10 15 20
 aac tgg atc gca gac gcc gtc gag ctc ttc cag cct gag gct gtt gtg 2132
 Asn Trp Ile Ala Asp Ala Val Glu Leu Phe Gln Pro Glu Ala Val Val
 25 30 35
 45 ttc gtt gat gga tcc cag gct gag tgg gat cgc atg gcg gag gat ctt 2180
 Phe Val Asp Gly Ser Gln Ala Glu Trp Asp Arg Met Ala Glu Asp Leu
 40 45 50
 gtt gaa gcc ggt acc ctc atc aag ctc aac gag gaa aag cgt ccg aac 2228
 Val Glu Ala Gly Thr Leu Ile Lys Leu Asn Glu Glu Lys Arg Pro Asn
 55 60 65
 55 agc tac cta gct cgt tcc aac cca tct gac gtt gcg cgc gtt gag tcc 2276
 Ser Tyr Leu Ala Arg Ser Asn Pro Ser Asp Val Ala Arg Val Glu Ser
 70 75 80 85



	cgc acc ttc atc tgc tcc gag aag gaa gaa gat gct ggc cca acc aac	2324
	Arg Thr Phe Ile Cys Ser Glu Lys Glu Glu Asp Ala Gly Pro Thr Asn	
	90 95 100	
5	aac tgg gct cca cca cag gca atg aag gaa gaa atg tcc aag cat tac	2372
	Asn Trp Ala Pro Pro Gln Ala Met Lys Asp Glu Met Ser Lys His Tyr	
	105 110 115	
10	gct ggt tcc atg aag ggg cgc acc atg tac gtc gtg cct ttc tgc atg	2420
	Ala Gly Ser Met Lys Gly Arg Thr Met Tyr Val Val Pro Phe Cys Met	
	120 125 130	
15	ggt cca atc agc gat ccg gac cct aag ctt ggt gtg cag ctc act gac	2468
	Gly Pro Ile Ser Asp Pro Asp Pro Lys Leu Gly Val Gln Leu Thr Asp	
	135 140 145	
20	tcc gag tac gtt gtc atg tcc atg cgc atc atg acc cgc atg ggt att	2516
	Ser Glu Tyr Val Val Met Ser Met Arg Ile Met Thr Arg Met Gly Ile	
	150 155 160 165	
25	gaa gcg ctg gac aag atc ggc gcg aac ggc agc ttc gtc agg tgc ctc	2564
	Glu Ala Leu Asp Lys Ile Gly Ala Asn Gly Ser Phe Val Arg Cys Leu	
	170 175 180	
30	cac tcc gtt ggt gct cct ttg gag cca ggc cag gaa gac gtt gca tgg	2612
	His Ser Val Gly Ala Pro Leu Glu Pro Gly Gln Glu Asp Val Ala Trp	
	185 190 195	
35	cct tgc aac gac acc aag tac atc acc cag ttc cca gag acc aag gaa	2660
	Pro Cys Asn Asp Thr Lys Tyr Ile Thr Gln Phe Pro Glu Thr Lys Glu	
	200 205 210	
40	att tgg tcc tac ggt tcc ggc tac ggc gga aac gca atc ctg gca aag	2708
	Ile Trp Ser Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Gly Asn Ala Ile Leu Ala Lys	
	215 220 225	
45	aag tgc tac gca ctg cgt atc gca tct gtc atg gct cgc gaa gaa gga	2756
	Lys Cys Tyr Ala Leu Arg Ile Ala Ser Val Met Ala Arg Glu Glu Gly	
	230 235 240 245	
50	tgg atg gct gag cac atg ctc atc ctg aag ctg atc aac cca gag ggc	2804
	Trp Met Ala Glu His Met Leu Ile Leu Lys Leu Ile Asn Pro Glu Gly	
	250 255 260	
55	aag gcg tac cac atc gca gca gca ttc cca tct gct tgt ggc aag acc	2852
	Lys Ala Tyr His Ile Ala Ala Ala Phe Pro Ser Ala Cys Gly Lys Thr	
	265 270 275	
60	aac ctc gcc atg atc act cca acc atc cca ggc tgg acc gct cag gtt	2900
	Asn Leu Ala Met Ile Thr Pro Thr Ile Pro Gly Trp Thr Ala Gln Val	
	280 285 290	
65	gtt ggc gac gac atc gct tgg ctg aag ctg cgc gag gac ggc ctc tac	2948
	Val Gly Asp Asp Ile Ala Trp Leu Lys Leu Arg Glu Asp Gly Leu Tyr	
	295 300 305	



	gca gtt aac cca gaa aat ggt ttc ttc ggt gtt gct cca ggc acc aac	2996
	Ala Val Asn Pro Glu Asn Gly Phe Phe Gly Val Ala Pro Gly Thr Asn	
	310 315 320 325	
5	tac gca tcc aac cca atc gcg atg aag acc atg gaa cca ggc aac acc	3044
	Tyr Ala Ser Asn Pro Ile Ala Met Lys Thr Met Glu Pro Gly Asn Thr	
	330 335 340	
10	ctg ttc acc aac gtg gca ctc acc gac gac ggc gac atc tgg tgg gaa	3092
	Leu Phe Thr Asn Val Ala Leu Thr Asp Asp Gly Asp Ile Trp Trp Glu	
	345 350 355	
15	ggc atg gac ggc gac gcc cca gct cac ctc att gac tgg atg ggc aac	3140
	Gly Met Asp Gly Asp Ala Pro Ala His Leu Ile Asp Trp Met Gly Asn	
	360 365 370	
20	gac tgg acc cca gag tcc gac gaa aac gct gct cac cct aac tcc cgt	3188
	Asp Trp Thr Pro Glu Ser Asp Glu Asn Ala Ala His Pro Asn Ser Arg	
	375 380 385	
25	tac tgc gta gca atc gac cag tcc cca gca gca gca cct gag ttc aac	3236
	Tyr Cys Val Ala Ile Asp Gln Ser Pro Ala Ala Ala Pro Glu Phe Asn	
	390 395 400 405	
30	gac tgg gaa ggc gtc aag atc gac gca atc ctc ttc ggt gga cgt cgc	3284
	Asp Trp Glu Gly Val Lys Ile Asp Ala Ile Leu Phe Gly Gly Arg Arg	
	410 415 420	
35	gca gac acc gtc cca ctg gtt acc cag acc tac gac tgg gag cac ggc	3332
	Ala Asp Thr Val Pro Leu Val Thr Gln Thr Tyr Asp Trp Glu His Gly	
	425 430 435	
40	acc atg gtt ggt gca ctg ctc gca tcc ggt cag acc gca gct tcc gca	3380
	Thr Met Val Gly Ala Leu Leu Ala Ser Gly Gln Thr Ala Ala Ser Ala	
	440 445 450	
45	gaa gca aag gtc ggc aca ctc cgc cac gac cca atg gca atg ctc cca	3428
	Glu Ala Lys Val Gly Thr Leu Arg His Asp Pro Met Ala Met Leu Pro	
	455 460 465	
50	ttc att ggc tac aac gct ggt gaa tac ctg cag aac tgg att gac atg	3476
	Phe Ile Gly Tyr Asn Ala Gly Glu Tyr Leu Gln Asn Trp Ile Asp Met	
	470 475 480 485	
55	ggt aac aag ggt ggc gac aag atg cca tcc atc ttc ctg gtc aac tgg	3524
	Gly Asn Lys Gly Gly Asp Lys Met Pro Ser Ile Phe Leu Val Asn Trp	
	490 495 500	
50	ttc cgc cgt ggc gaa gat gga cgc ttc ctg tgg cct ggc ttc ggc gac	3572
	Phe Arg Arg Gly Glu Asp Gly Arg Phe Leu Trp Pro Gly Phe Gly Asp	
	505 510 515	
55	aac tct cgc gtt ctg aag tgg gtc atc gac cgc atc gaa ggc cac gtt	3620
	Asn Ser Arg Val Leu Lys Trp Val Ile Asp Arg Ile Glu Gly His Val	
	520 525 530	

ggc gca gac gag acc gtt gtt gga cac acc gct aag gcc gaa gac ctc 3668
 Gly Ala Asp Glu Thr Val Val Gly His Thr Ala Lys Ala Glu Asp Leu
 535 540 545
 5 gac ctc gac ggc ctc gac acc cca att gag gat gtc aag gaa gca ctg 3716
 Asp Leu Asp Gly Leu Asp Thr Pro Ile Glu Asp Val Lys Glu Ala Leu
 550 555 560 565
 10 acc gct cct gca gag cag tgg gca aac gac gtt gaa gac aac gcc gag 3764
 Thr Ala Pro Ala Glu Gln Trp Ala Asn Asp Val Glu Asp Asn Ala Glu
 570 575 580
 15 tac ctc act ttc ctc gga cca cgt gtt cct gca gag gtt cac agc cag 3812
 Tyr Leu Thr Phe Leu Gly Pro Arg Val Pro Ala Glu Val His Ser Gln
 585 590 595
 ttc gat gct ctg aag gcc cgc att tca gca gct cac gct taaagtccac 3861
 Phe Asp Ala Leu Lys Ala Arg Ile Ser Ala Ala His Ala
 20 600 605 610
 gcttaagaac tgctaaataa caagaaaggc tcccaccgaa agtgggagcc tttctgtcg 3921
 25 ttaagcgatg aatt 3935

A 2. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

- (A) HOSSZ: 610 aminosav
(B) TÍPUS: fehérje

(vi) EREDETI FORRÁS:

- (A) SZERVEZET: *Corynebacterium glutamicum*

(xi) A 2. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

35	Met	Thr	Thr	Ala	Ala	Ile	Arg	Gly	Leu	Gln	Gly	Glu	Ala	Pro	Thr	Lys	1	5	10	15
	Asn	Lys	Glu	Leu	Leu	Asn	Trp	Ile	Ala	Asp	Ala	Val	Glu	Leu	Phe	Gln	20	25	30	
40	Pro	Glu	Ala	Val	Val	Phe	Val	Asp	Gly	Ser	Gln	Ala	Glu	Trp	Asp	Arg	35	40	45	
	Met	Ala	Glu	Asp	Leu	Val	Glu	Ala	Gly	Thr	Leu	Ile	Lys	Leu	Asn	Glu	50	55	60	
45	Glu	Lys	Arg	Pro	Asn	Ser	Tyr	Leu	Ala	Arg	Ser	Asn	Pro	Ser	Asp	Val	65	70	75	80
	Ala	Arg	Val	Glu	Ser	Arg	Thr	Phe	Ile	Cys	Ser	Glu	Lys	Glu	Glu	Asp	85	90	95	
50	Ala	Gly	Pro	Thr	Asn	Asn	Trp	Ala	Pro	Pro	Gln	Ala	Met	Lys	Asp	Glu	100	105	110	
55	Met	Ser	Lys	His	Tyr	Ala	Gly	Ser	Met	Lys	Gly	Arg	Thr	Met	Tyr	Val	115	120	125	
	Val	Pro	Phe	Cys	Met	Gly	Pro	Ile	Ser	Asp	Pro	Asp	Pro	Lys	Leu	Gly	130	135	140	

6555

	Val	Gln	Leu	Thr	Asp	Ser	Glu	Tyr	Val	Val	Met	Ser	Met	Arg	Ile	Met	
	145					150					155					160	
5	Thr	Arg	Met	Gly	Ile	Glu	Ala	Leu	Asp	Lys	Ile	Gly	Ala	Asn	Gly	Ser	
				165						170					175		
	Phe	Val	Arg	Cys	Leu	His	Ser	Val	Gly	Ala	Pro	Leu	Glu	Pro	Gly	Gln	
				180					185					190			
10	Glu	Asp	Val	Ala	Trp	Pro	Cys	Asn	Asp	Thr	Lys	Tyr	Ile	Thr	Gln	Phe	
			195					200					205				
	Pro	Glu	Thr	Lys	Glu	Ile	Trp	Ser	Tyr	Gly	Ser	Gly	Tyr	Gly	Gly	Asn	
		210					215					220					
15	Ala	Ile	Leu	Ala	Lys	Lys	Cys	Tyr	Ala	Leu	Arg	Ile	Ala	Ser	Val	Met	
	225					230					235					240	
	Ala	Arg	Glu	Glu	Gly	Trp	Met	Ala	Glu	His	Met	Leu	Ile	Leu	Lys	Leu	
20					245					250					255		
	Ile	Asn	Pro	Glu	Gly	Lys	Ala	Tyr	His	Ile	Ala	Ala	Ala	Phe	Pro	Ser	
				260					265					270			
25	Ala	Cys	Gly	Lys	Thr	Asn	Leu	Ala	Met	Ile	Thr	Pro	Thr	Ile	Pro	Gly	
			275					280					285				
	Trp	Thr	Ala	Gln	Val	Val	Gly	Asp	Asp	Ile	Ala	Trp	Leu	Lys	Leu	Arg	
		290					295					300					
30	Glu	Asp	Gly	Leu	Tyr	Ala	Val	Asn	Pro	Glu	Asn	Gly	Phe	Phe	Gly	Val	
	305					310					315					320	
	Ala	Pro	Gly	Thr	Asn	Tyr	Ala	Ser	Asn	Pro	Ile	Ala	Met	Lys	Thr	Met	
35					325					330					335		
	Glu	Pro	Gly	Asn	Thr	Leu	Phe	Thr	Asn	Val	Ala	Leu	Thr	Asp	Asp	Gly	
				340					345					350			
40	Asp	Ile	Trp	Trp	Glu	Gly	Met	Asp	Gly	Asp	Ala	Pro	Ala	His	Leu	Ile	
			355					360					365				
	Asp	Trp	Met	Gly	Asn	Asp	Trp	Thr	Pro	Glu	Ser	Asp	Glu	Asn	Ala	Ala	
		370					375					380					
45	His	Pro	Asn	Ser	Arg	Tyr	Cys	Val	Ala	Ile	Asp	Gln	Ser	Pro	Ala	Ala	
	385					390					395					400	
	Ala	Pro	Glu	Phe	Asn	Asp	Trp	Glu	Gly	Val	Lys	Ile	Asp	Ala	Ile	Leu	
50					405					410					415		
	Phe	Gly	Gly	Arg	Arg	Ala	Asp	Thr	Val	Pro	Leu	Val	Thr	Gln	Thr	Tyr	
				420					425					430			
55	Asp	Trp	Glu	His	Gly	Thr	Met	Val	Gly	Ala	Leu	Leu	Ala	Ser	Gly	Gln	
			435					440					445				
	Thr	Ala	Ala	Ser	Ala	Glu	Ala	Lys	Val	Gly	Thr	Leu	Arg	His	Asp	Pro	
	450						455					460					

30

Szabadalmi igénypontok

1. Coryneform baktériumokból izolált polinukleotid, amely a következőket tartalmazó csoportból választott polinukleotid-szekvenciát tartalmaz:

a) polinukleotid, amely legalább 70%-ban azonos a 2. számú szekvenciában található aminosav-szekvenciával rendelkező polipeptidet kódoló polinukleotiddal;

b) polinukleotid, amely legalább 70%-ban azonos a nevezett polipeptidet kódoló polinukleotiddal és a pEK-pckA (1. ábra) illetve a pEK-pckB (2. ábra) plazmidon található;

c) polinukleotid, amely a 2. számú aminosav-szekvenciával legalább 70%-ban azonos aminosav-szekvenciával rendelkező polipeptidet kódol;

d) polinukleotid, amely az a), b) vagy c) polinukleotidokkal komplementer és

e) polinukleotid, amely az a), b), c) vagy d) polinukleotid-szekvenciának legalább 15 egymást követő bázisát tartalmazza.

2. Az 1. igénypont szerinti polinukleotid, amelynél a polinukleotid replikációra képes, előnyösen rekombináns DNS.

3. Az 1. igénypont szerinti polinukleotid, amelynél a polinukleotid RNS.

4. A 2. igénypont szerinti polinukleotid, amely az 1. számú szekvenciában bemutatott nukleinsav-szekvenciát tartalmazza.

5. A 2. igénypont szerinti replikációra képes DNS, amely

i) az 1. számú szekvenciában bemutatott nukleotid-szekvenciát, vagy

ii) legalább egy, az i) szekvenciának a genetikai kód degeneráltságán belül megfelelő szekvenciát, vagy

iii) legalább egy, az i) vagy ii) szekvenciával komplementer szekvenciával hibridizáló szekvenciát, és/vagy adott esetben

iv) i)-ben működésre semleges szenz mutációkat tartalmaz.

6. A 2. igénypont szerinti polinukleotid-szekvencia, amely a 2. számú szekvenciában bemutatott aminosav-szekvenciával rendelkező polipeptidet kódol.

7. Az 1. ábrán bemutatott pEK-pckA vektor.

8. A 2. ábrán bemutatott pEK-pckB vektor.

9. A 3. ábrán bemutatott és az *E. coli* DH5 α törzsben a DSM 13047 szám alatt letétbe helyezett pK19mobsacB Δ pck vektor.

10. Gazdaszervezetként szolgáló coryneform baktériumok, amelyek a 6-8. igénypontok szerinti vektorok valamelyikét tartalmazzák vagy amelyekbe beépítettük a Δ pck deléciót.

11. Eljárás L-aminosavak fermentatív előállítására, azzal jellemezve, hogy olyan baktériumokat alkalmazunk, amelyekben

a) az 1. igénypont szerinti polinukleotidot legyengítjük vagy a nevezett polinukleotid által kódolt polipeptid aktivitását csökkentjük.

b) a kívánt terméket a tápoldatban vagy a baktériumok sejtjeiben dúsítjuk fel és

c) izoláljuk a terméket.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy *Corynebacterium glutamicum* fajba tartozó baktériumokat alkalmazunk.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy

a legyengítést integrációs mutagenézissel, a 3. ábrán bemutatott és DSM 13047 számon letétbe helyezett pK19mobsacBΔpck plazmid segítségével érjük el.

14. A 12. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy L-lizin előállításához olyan baktériumokkal fermentálunk, amelyekben adott esetben

- egyidejűleg a dihidro-dipikolinát szintetázt kódoló dapA gént túlzottan kifejezzük és/vagy
- egyidejűleg egy S-(2-aminoetil)-cisztein rezisztenciát közvetítő DNS fragmentumot megsokszorozunk.

15. A 12. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy L-treonin előállításához olyan baktériumokkal fermentálunk, amelyekben adott esetben egyidejűleg a homoszerin-dehidrogenázt kódoló hom gént vagy egy „feed back rezisztens” homoszerin-dehidrogenázt kódoló hom^{dr} illetve hom_{FBR} allélt túlzottan kifejezzük.

A meghatalmazott:

Parragh Gábor

Parragh Gábor dr.
szabadalmi ügyvivő
az S.B.C. & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

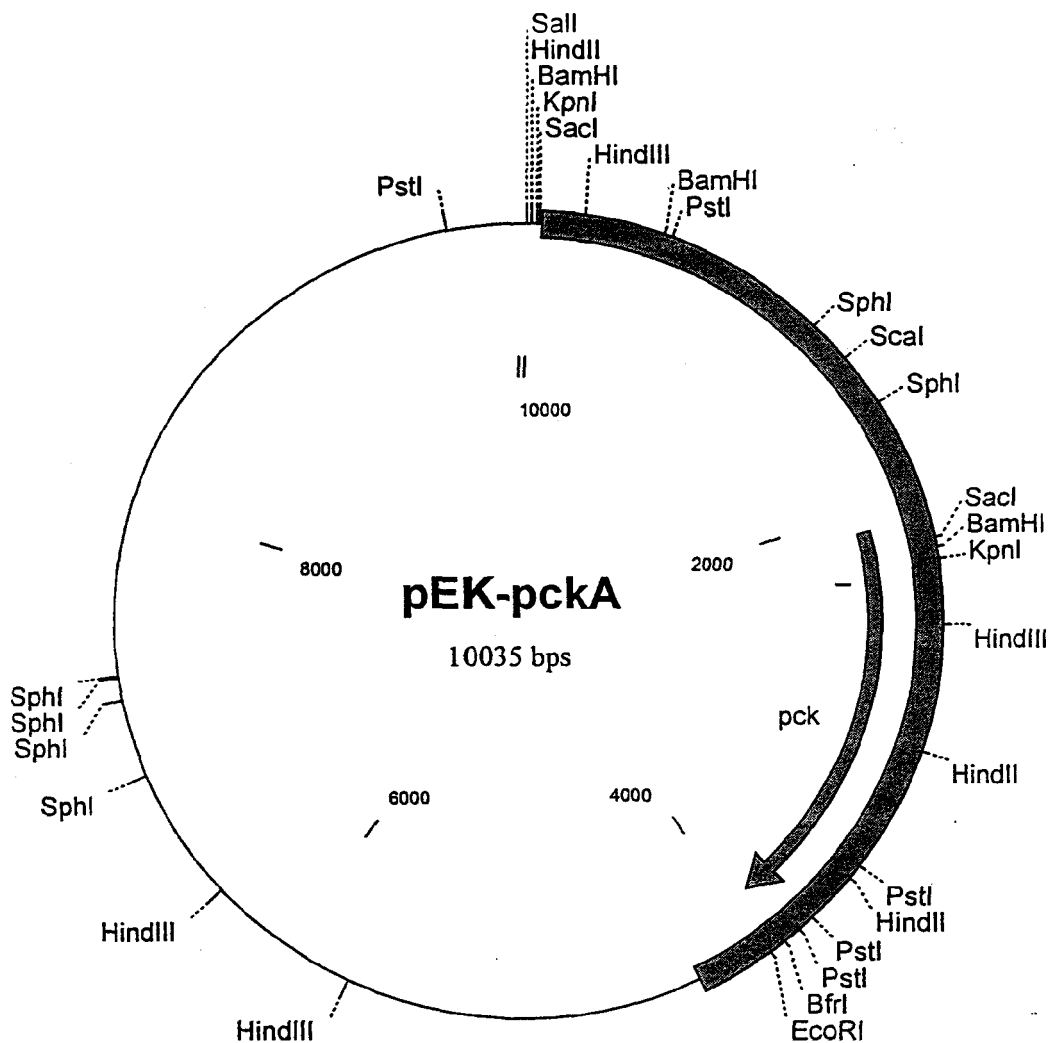
Béla

János

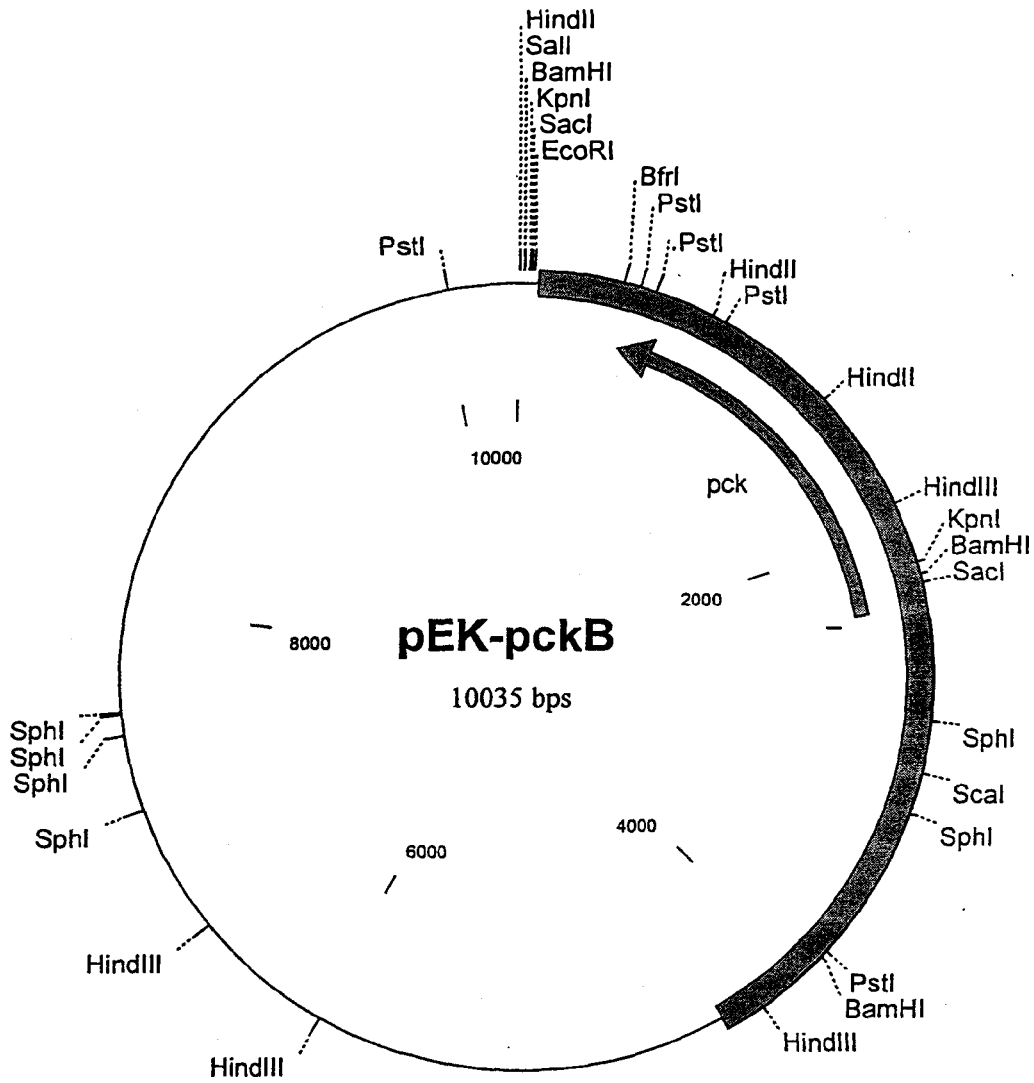
41 oldal

R. ...

1. ábra



2. ábra



3. ábra

