

**K I V O N A T****Eljárás D-pantoténsav fermentációs előállítására a panD gén  
megerősítésével mikroorganizmusokban**

A találmány tárgyát D-pantoténsav fermentációs előállítására szolgáló eljárás képezi olyan mikroorganizmusok alkalmazásával, amelyek közvetlenül D-pantoténsavat termelnek és amelyekben az L-aszpartát-1 dekarboxilázt kódoló panD gén egymagában vagy a panB és/vagy a panC génekkel kombináltan felerősítve, különösen fokozottan fejeződik ki.

A találmány tárgyát képezik továbbá megfelelő rekombináns DNS szekvenciák és nevezett szekvenciákat tartalmazó expressziós vektorok, amelyekkel alkalmas mikroorganizmusokat transzformálva, javított D-pantoténsav termelő törzsek állíthatók elő.

*Fodor*

**Eljárás D-pantoténsav fermentációs előállítására a panD gén  
megerősítésével mikroorganizmusokban**

A pantoténsav olyan kereskedelmileg jelentős vitamin, amely a kozmetikában, a gyógyászatban, a humán táplálkozásban és az állati táplálkozásban kerül felhasználásra.

Pantoténsav előállítható kémiai szintézissel vagy biotechnológiai úton, megfelelő mikroorganizmusok alkalmas tápoldatokban történő fermentációjával. A kémiai szintézisnél a D,L-pantolakton egy fontos közbenső termék. Többlépcsős eljárással állítják elő formaldehidből, izobutil-aldehidből és cianidból. További eljárási lépésekben felbontják a racém keveréket és D-pantolaktont  $\beta$ -alaninnal kondenzálva nyernek D-pantoténsavat.

A mikroorganizmusokkal történő fermentációs előállítás előnye a kívánt, L-pantoténsavtól mentes, D-formájú sztereoizomer közvetlen képződésében rejlik.

Baktériumok különböző fajtái, mint például *Escherichia coli*, *Arthrobacter urefaciens*, *Corynebacterium erythrogenes*, *Brevibacterium ammoniagenes*, és élesztők is, mint például *Debaromyces castellii* képesek - ahogyan azt az EP-A 0493060 számú szabadalmi irat mutatja - glükózt, D,L-pantoinsavat és  $\beta$ -alanint tartalmazó tápoldatban D-pantoténsavat előállítani. Az EP-A 0493060 számú szabadalmi irat bemutatja továbbá, hogy *Escherichia coli*-nál a pFV3 és pFV5 plazmidokon található, a pantoténsav bioszintéziséért felelős gének megsokszorozásával glükózt, D,L-pantoténsavat és  $\beta$ -alanint



tartalmazó tápoldatban a D-pantoténsav képződése javul.

Az EP-A 0590857 számú szabadalmi irat és az U.S.P. 5,518,906 számú szabadalmi irat *Escherichia coli* IFO3547 törzsből levezetett olyan mutánsokat - FV5714, FV525, FV814, FV521, FV221, FV6051 és FV5069 - ír le, amelyek különböző antimetabolitokkal, mint szalicilsavval,  $\alpha$ -ketovajsavval,  $\beta$ -hidroxi-aszparaginsavval, O-metil-treoninnal és  $\alpha$ -ketoizovaleriánsavval szemben rezisztenciával rendelkeznek, és glükózt tartalmazó tápoldatban pantoinsavat és glükózt és  $\beta$ -alanint tartalmazó tápoldatban D-pantoténsavat termelnek. Az EP-A 0590857 számú szabadalmi iratban és az U.S.P. 5,518,906 számú szabadalmi iratban továbbá megmutatják, hogy a pantoténsav bioszintéziséért felelős gének - amelyek a pFV31 plazmidon találhatóak - a fent megnevezett törzsekben glükózt tartalmazó tápoldatban a pantoinsav és glükózt és  $\beta$ -alanint tartalmazó tápoldatban a D-pantoténsav termelődését megjavítja.

A WO 97/10340 közzétételi számú nemzetközi szabadalmi bejelentésben ezenkívül megmutatják, hogy *Escherichia coli* pantoténsavat termelő törzseiben az acetohidroxisav szintetáz II enzim - a valin bioszintézis egy enzime - aktivitásának növelésével a pantoténsav termelődés tovább fokozható.

Találmányunkban pantoténsav fermentatív előállítására szolgáló javított eljárás alapjainak rendelkezésre bocsátását tűztük ki feladatul.

A pantoténsav vitamin olyan kereskedelmileg jelentős termék, amely a kozmetikában, a gyógyászatban, a humán táplálkozásban és az

állati táplálkozásban kerül felhasználásra. Ezért általános az érdeklődés a pantoténsav előállítás új eljárásainak közzétételére.

A következőkben D-pantoténsav vagy pantoténsav vagy pantotenát említésekor nemcsak a szabad savra gondolunk, hanem beleértjük a pantoténsav sóit is, mint például kalcium-, nátrium-, ammónium- vagy kálium-sóját.

A találmány tárgyát mindenekelőtt D-pantoténsav fermentációs előállítására szolgáló eljárás képezi olyan mikroorganizmusok alkalmazásával, amelyek közvetlenül D-pantoténsavat termelnek és amelyekben az L-aszpartát-1 dekarboxilázt (E.C. 4.1.1.11) kódoló panD gént egymagában vagy a panB és/vagy a panC génekkel kombináltan felerősítjük, különösen fokozottan kifejezzük. A találmány tárgyát képezik továbbá az igénypontokban leírtak szerinti, megfelelő rekombináns DNS szekvenciák. Szintén a találmány tárgyát képezi D-pantoténsav fermentációs előállítása, amelyet a 8-17. igénypontokban leírtak szerint előállított, javított D-pantoténsav termelő mikroorganizmusok alkalmazásával végzünk.

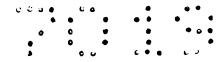
A „felerősítés” fogalom ebben az összefüggésben egy mikroorganizmusban egy vagy több enzim intracelluláris aktivitásának növelését jelenti. Ezeket az enzimeket a megfelelő DNS kódolja, amelyben például megnöveljük a gén illetve a gének másolatainak számát, erős promótert vagy olyan gént alkalmazunk, amely a megfelelő enzimet nagy aktivitással kódolja, és adott esetben ezeket a műveleteket kombináljuk.

A találmány tárgyát képező mikroorganizmusok glükózból, sza-

charózból, laktózból, fruktózból, maltózból, melaszából, keményítőből, cellulózból vagy glicerinnél és etanolból képesek pantoténsav előállítására. Szóba jöhetnek penészgombák vagy élesztők vagy Gram-pozitív baktériumok, például *Corynebacterium* nemzetség, vagy Gram-negatív baktériumok, mint például az Enterobacteriaceae család tagjai. Az Enterobacteriaceae családnál különösen az *Escherichia* nemzetség az *Escherichia coli* fajjal említendő. Az *Escherichia coli* fajon belül meg kell említeni az úgynevezett K-12 törzseket, mint például az MG1655-t vagy a W3110-t [Neidhard et al., *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology (ASM Press, Washington D.C.)] vagy a vad típusú *Escherichia coli* IFO3547 törzset (Fermentációs Intézet Osaka, Japán) és az abból levezetett mutánsokat. A *Corynebacterium* nemzetségnél különösen a *Corynebacterium glutamicum* faj említésre méltó, amely szakmai körökben aminosavtermelő képességéről ismert. Ezek közé a fajták közé tartoznak a vad típusú törzsek, mint például *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Brevibacterium flavum* ATCC14067, *Corynebacterium melassecola* ATCC17965 és ezekből levezetett mutánsok.

Felfedezésünk szerint az új - különösen *Corynebacterium glutamicum*-ból származó - L-aszpartát-1 dekarboxiláz (E.C. 4.1.1.11) kódolásáért felelős panD gén fokozott kifejeződését követően mikroorganizmusok több pantoténsavat termelnek.

Ezenkívül felfedeztük, hogy a panD gén fokozott kifejeződése olyan törzsekben hat előnyösen, amelyekben ráadásként a keto-



pantoát-hidroximetil transzferázt és pantotenát szintetázt kódoló panB és panC gének is egyenként vagy együttesen fokozottan fejeződnek ki.

Fokozott kifejeződés eléréséhez megemelhető a megfelelő gének másolatainak száma, vagy mutáció hozható létre a struktúrgéntől felfelé (upstream) elhelyezkedő promóter és szabályozó régióban. Ugyanígy hatnak expressziós kazetták, amelyeket a struktúrgéntől felfelé építünk be. Indukálható promóterek révén további lehetőség nyílik a kifejeződés fokozására a fermentatív D-pantoténsav képződés folyamán. A m-RNS élettartamának meghosszabbítására irányuló intézkedések szintén javítják a kifejeződést. Továbbá az enzimek lebomlásának megakadályozása szintén erősíti az enzimaktivitást. A gének vagy génszerkezetek rendelkezésre állhatnak különböző másolatszámokban plazmidokban vagy beépíthetők kromoszómába és megsokszorozhatók (amplifikálhatók). Továbbá egy másik megoldásként az érintett gén fokozott kifejeződése elérhető a tápoldatösszetétel és tenyésztési körülmények megváltoztatásával.

Ezekhez a módszerekhez útmutatást talál a szakember többek között [Martin et al., *Bio/Technology* 5, 137-146 (1987); Guerrero et al., *Gene* 138, 35-41 (1994); Tsuchiya and Morinaga, *Bio/Technology* 6, 428-430 (1988); Eikmanns et al., *Gene* 102, 93-98 (1991); EPS 0 472 869 számú európai szabadalmi leírás; U.S.P. 4,601,893 számú szabadalmi irat; Schwarzer and Pühler, *Bio/Technology* 9, 84-87 (1991); Reinscheid et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 126-132 (1994); LaBarre et al., *J. Bacteriol.* 175, 1001-1007 (1993); WO

96/15246 közzétételi számú nemzetközi szabadalmi bejelentés; Jensen and Hammer, *Biotechnol. Bioeng.* 58, 191-195 (1998) vagy *Manual of Methods for General Bacteriology* der American Society for Bacteriology, Washington D.C., USA (1981)].

Ezenkívül találunk még útmutatást [Chang and Cohen, *J. Bacteriol.* 134, 1141-1156 (1978); Hartley and Gregori, *Gene* 13, 347-353 (1981); Amann and Brosius, *Gene* 40, 183-190 (1985); Broer et al., *Proceedings of the National of Sciences of the United States of America* 80, 21-25 (1983); LaVallies et al., *Bio/Technology* 11, 187-193 (1993); PCT/US 97/13359 számú nemzetközi szabadalmi bejelentés; Llosa et al., *Plasmid* 26, 222-224 (1991); Quandt and Klipp, *Gene* 80, 161-169 (1989); Hamilton, *J. Bacteriol.* 171, 4617-4622 (1989); Makrides, *Microbiol. Rev.* 60, 512-538 (1996)] és a genetika és molekuláris biológia ismert tankönyveiben.

A panD gén vagy más gének - mint például panB és panC - *C. glutamicum*-ból történő izolálásához mindenekelőtt ennek a mikroorganizmusnak egy génbankját hozzuk létre *E. coli*-ban. Génbankok létesítését általánosan ismert tankönyvek és kézikönyvek írják le. Példaként említjük Winnacker: *Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie* (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990) vagy Sambrook és munkatársai: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) könyveit. Egy ismert génbank az *E. coli* K-12 W3110 törzsé, amelyet Kohara és munkatársai  $\lambda$ -vektorokban hoztak létre [*Cell* 50, 495-508 (1987)]. Bathe és munkatársai olyan génbankot írnak le [*Molecular and General*



Genetics 252, 255-265 (1996)], amelyet *C. glutamicum* ATCC13032 törzsből a SuperCos I kozmid vektor segítségével [Wahl et al., Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84, 2160-2164 (1987)] *E. coli* K-12 NM554 törzsből [Raleigh et al., Nuc. Acids Res. 16, 1563-1575 (1988)] hoztak létre. *C. glutamicum* génbank létrehozására *E. coli*-ban plazmidok is - mint pBR322 [Bolivar, Life Sciences 25, 807-818 (1979)] vagy pUC9 [Viera et al., Gene 19, 259-268 (1982)] - felhasználhatók. Gazdaszervezetként különösen alkalmasak olyan *E. coli* törzsek, amelyek restriktió- és rekombinációhiányosak. Erre egy példa a Grant és munkatársai által leírt DH5 $\alpha$ mc<sup>r</sup> törzs [Proceedings of the National Academy of Sciences USA 87, 4645-4649 (1990)]. A génbankot azután egy indikátor törzsbe építjük be transzformációval [Hanahan, J. Mol. Biol. 166, 557-580 (1983)] vagy elektroporációval [Tauch et al., FEMS Microbiol. Lett. 123, 343-347 (1994)]. Az indikátor törzs azáltal mutatkozik meg, hogy az érdeklődésre számottartó génben mutációval rendelkezik, amely egy kimutatható fenotípusos jegyet, például auxotrófiát idéz elő. A találmány keretein belül a panD génben mutációval rendelkező *E. coli* DV9 mutáns [Vallari and Rock, J. Bacteriol. 164, 136-142 (1985)] különös jelentőségű. Egy másik példa pantoténsavat igénylő *E. coli* mutánsra az SJ2 törzs, amely a panB génben rendelkezik mutációval és a Yale Egyetem Genetikai Központjától (Genetic Stock Center of Yale University, New Haven, Connecticut, USA) szerezhető be. Az indikátor törzs transzformációja - mint például a panD mutáns DV9 transzformációja egy, az érdeklődésre számottartó gént,

mint például a panD gént hordozó rekombináns plazmival – és az érintett gén kifejeződése után az indikátor törzs a megfelelő tulajdonságot, mint például a pantoténsav igényt illetően prototróf lesz. Az ilyenformán izolált gén illetve DNS fragmentum a szekven-  
cia meghatározásával [mint például Sanger et al., Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74, 5463-5467 (1977)] leírható és jellemezhető. Ezután publikált módszerekkel analizálható az azo-  
nosság foka [Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)] az adatbankokban, mint például a GenBank-ban található ismert génekkel [Benson et al., Nuc. Acids Res. 26, 1-7 (1998)] összevetve.

Ilyen módon kaptuk meg az új, a panD gén kódoló DNS szekvenci-  
áját *C. glutamicum*-ból, amely 1. számú szekvenciaként a találmány  
részét képezi. Továbbá a rendelkezésre álló DNS szekvenciából a  
fent leírt módszerekkel levezettük a megfelelő enzim aminosav-  
szekvenciáit. A 2. számú szekvenciában a panD gén termékének, neve-  
zetesen az L-aszpartát-1 dekarboxiláznak az így adódó aminosav-  
szekvenciáját szemléltetjük. Továbbá ilyen úton kaptuk meg az új,  
panB és panC kódoló DNS szekvenciáját *C. glutamicum*-ból, amely 3.  
számú szekvenciaként a találmány részét képezi. A 4. számú szekven-  
ciában a panB gén termékének, nevezetesen a ketopantoát-hidroxi-  
metil transzferáznak és az 5. számú szekvenciában a panC gén termé-  
kének, nevezetesen a pantotenát szintetáznak az így adódó aminosav-  
szekvenciáját szemléltetjük.

Olyan kódoló DNS szekvenciák, amelyek az 1. számú szekvenciá-  
ból és/vagy 3. számú szekvenciából a genetikai kód degeneráltsága

folytán adódnak, szintén a találmány tárgyát képezik. Ehhez hasonló módon az 1. számú szekvenciával és/vagy 3. számú szekvenciával hibridizáló DNS szekvenciák a találmány tárgyát képezik. Szakmai körökben továbbá olyan konzervatív aminosav kicserélődések, mint például glicin cseréje alaninra vagy aszparaginsav cseréje glutaminsavra fehérjékben „szenz mutációként” ismertek, amelyek nem vezetnek a fehérje aktivitásának alapvető megváltozásához, azaz működés semlegesek (funktionsneutral). Továbbá ismert, hogy változások egy fehérje N- és/vagy C-végén annak működését lényegesen nem korlátozzák, sőt stabilizálhatják. Ezekről talál a szakember közleményeket többek között az alábbiakban [Ben-Bassat et al., J. Bacteriol. 169, 751-757 (1987); O'Regan et al., Gene 77, 237-251 (1989); Sahin-Toth et al., Protein Sciences 3, 240-247 (1994); Hochuli et al., Bio/Technology 6, 1321-1325 (1988) és ismert genetikai és molekulárbiológiai tankönyvekben. Azok az aminosav-szekvenciák, amelyek a 2. számú, 4. számú és 5. számú szekvenciából ennek megfelelően adódnak, szintén a találmány tárgyát képezik.

Az ilyen módon jellemzett gént azután egyedül vagy másokkal kombináltan kifejezhetjük alkalmas mikroorganizmusban. Ismert módszer gének kifejezésére illetve fokozott kifejezésére ezeknek plazmid vektorok segítségével történő megsokszorozása (amplifikálása), amelyeket ezenfelül expressziós szignállal láthatunk el. Plazmid vektorként olyanok jöhetnek számításba, amelyek a megfelelő mikroorganizmusokban replikálódni tudnak. *Escherichia coli* számára például a pSC101 [Vocke and Bastia, Proceedings of the National

Academy of Sciences USA 80(21), 6557-6561 (1983)] vagy a pKK223-3 [Brosius and Holy, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81, 6929 (1984)] vektor, *Corynebacterium glutamicum* számára például a pEKEx1 [Eikmanns et al., Gene 102, 93-98 (1991)] vagy a pZ8-1 [EP 0 375 889 számú európai szabadalmi leírás] vektor jöhet számításba a jelen találmányban. Ilyen mikroorganizmusokra példák az ATCC13032/pND-D2 és ATCC13032/pND-DBC2 *C. glutamicum* törzsek, és az MG1655/pND-D2 *E. coli* törzs, amelyek a pND-D2 és pND-DBC2 plazmidokat tartalmazzák. A pND-D2 plazmid a pZ8-1 plazmidon alapuló *E. coli-C. glutamicum* ingavektor, amely a *C. glutamicumból* származó panD gént hordozza. A pND-DBC2 plazmid a pZ8-1 plazmidon alapuló *E. coli-C. glutamicum* ingavektor, amely a *C. glutamicumból* származó panD, panB és panC géneket hordozza.

A szakember számára nyilvánvaló, hogy kromoszómában történő olyan mutációk, amelyek metabolitok és antimetabolitok elleni rezisztenciát okoznak vagy amelyek a pantoténsav képződését megelőző lépcsőfokok eltűnését megakadályozzák, a találmányban foglalt műveletekkel előnyösen kombinálhatók.

A találmány szerint előállított mikroorganizmusok pantoténsav termelés céljából tenyésztethetők folytonosan, vagy szakaszosan „batch fermentációval” vagy „fed batch” rátáplálásos technikával, vagy ismételt rátáplálásos módszerrel. Ismert tenyésztési módszerekről összefoglalás található Chmiel tankönyvében [Bioproszesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1991))] vagy Storhas tankönyvében

[Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden (1994)].

Az alkalmazandó tápoldatnak a mindenkori mikroorganizmusok igényeinek kell alkalmas módon megfelelnie. Különböző mikroorganizmusok szaporító tápoldatainak leírásai találhatóak a [Manual of Methods for General Bacteriology, American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA (1981)] kézikönyvben. Szénforrásként felhasználható cukor és szénhidrát, mint például glükóz, szacharóz, lak-tóz, 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 glicerin és etanol, és szerves savak, mint például ecetsav. Ezek az anyagok egyedül vagy keverék-ként alkalmazhatók. Nitrogénforrásként felhasználhatók szerves nitrogéntartalmú vegyületek, mint pepton, élesztőkivonat, húskivonat, malátakivonat, kukoricalekvár, szójaliszt és karbamid, vagy szervetlen vegyületek, mint ammónium-szulfát, ammónium-klorid, ammóni-um-foszfát, ammónium-karbonát és ammónium-nitrát. A nitrogénforrá-sok egyedül vagy keverékként alkalmazhatók. Foszforforrásként al-kalmazható kálium-dihidrogénfoszfát vagy dikálium-hidrogénfoszfát vagy a megfelelő nátrium só. A szaporító tápoldatnak továbbá tar-talmaznia kell fémsókat, mint például magnézium-szulfátot vagy vas-szulfátot, amelyek a növekedéshez elengedhetetlenek. Végül a fent említett anyagokhoz kiegészítésként adhatók létfontosságú növeke-dést serkentők, mint aminosavak és vitaminok. Ezenfelül a szaporító

tápoldat a pantoténsav termelés további fokozása érdekében kiegészíthető a pantoténsav elővegyületeivel (prekursoraival), aszpartáttal,  $\beta$ -alaninnal, ketoizovaleráttal, ketopantoinsavval vagy pantoinsavval és adott esetben ezek sóival. A nevezett kiegészítő anyagok egyszeri kiegészítésként vagy a szaporítás során megfelelő módon adagolva adhatók a tenyészethez.

A tenyészet pH kontrolljához bázikus vegyületeket – mint nátrium-hidroxid, kálium-hidroxid, ammónia – vagy savas vegyületeket – mint foszforsav vagy kénsav – adagolunk megfelelő módon. A túlzott habképződés elkerülésére habzásgátló szert, mint például zsírsav-poliglikolésztert adagolhatunk. Plazmidok stabilitásának fenntartásához alkalmas, szelektíven ható anyagokat, például antibiotikumokat adhatunk a tápoldathoz. Aerob viszonyok fenntartása érdekében oxigént vagy oxigént tartalmazó gázkeveréket, például levegőt juttatunk a tenyészethez. A tenyésztés hőmérséklete normális esetben 20-50 °C között, előnyösen 25-45 °C között van. A szaporítást annyi ideig végezzük, amíg a pantoténsav képződés maximumot ér el. Ezt a célt normális esetben 10-160 órán belül érjük el.

Az nagy L-aszpartát-1 dekarboxiláz enzimaktivitással rendelkező törzsek felhasználhatók  $\beta$ -alanin L-aszpartátból történő előállítására is. Ehhez fermentációs eljárások, enzimes átalakulási reakciók vagy a kettő kombinációi alkalmazhatók.

A képződő pantoténsav koncentrációja ismert eljárásokkal meghatározható [Velisek, *Chromatographic Science* 60, 515-560 (1992)].

A következő mikroorganizmusokat helyeztük letétbe a Német Mik-



roorganizmusok és Sejtkultúrák Gyűjteményében (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ, Braunschweig, Deutschland) a budapesti szerződésnek megfelelően:

*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032/pND-D2 DSM12438 jelzéssel,

*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032/pND-DBC2 DSM12437 jelzéssel.

### **Példák**

A találmányt az alábbi, részletesen kifejtett példák segítségével világítjuk meg közelebbről.

#### **1. példa**

##### ***C. glutamicum*-ból származó panD gén klónozása és szekvenálása**

###### **1. A panD gén klónozása**

*C. glutamicum* ATCC13032-ből származó kromoszóma DNS-t izoláltunk Tauch és munkatársai leírása szerint [Plasmid 33, 168-179 (1995)] és *Sau3A* restrikciós enzimmal (Pharmacia Biotech, kódszám: 27-0913-02; Freiburg, Deutschland) részlegesen hasítottuk. 7-9 kb nagyságú DNS fragmentumokat izoláltunk „Nucleotrap Extraction Kit for Nucleic Acids” (Macherey Nagel, kat. szám: 740584; Düren, Deutschland) segítségével és az MBI Fermentas cégtől (Vilnius, Litauen) beszerzett, pUC19 vektor defoszforilezett *Bam*HI hasítási helyére [Norrander et al., *Gene* 26, 101-106 (1982)] ligáltuk. A ligálást a Sambrook és munkatársai által leírtak szerint [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor (1989)] végeztük, ahol a DNS keveréket T4 ligázzal (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) egy éjszakán keresztül inkubáltuk. Ezt a ligációs ke-



veréket azután *E. coli* DH5 $\alpha$ MCR törzsbe [Grant, Proceedings of the National Academies of Sciences USA 87, 4645-4649 (1990)] vittük be elektroporációval [Tauch, FEMS Microbiol. Lett. 123, 343-347 (1994)] és 100  $\mu$ g/ml ampicillin tartalmú LB agarra [Lennox, Virology 1, 190 (1955)] szélesztettük. 24 órás, 37 °C-on történt inkubációt követően tudtuk a *C. glutamicum* génbankot a plazmid DNS - alkálikus lízis módszere szerinti [Birnboim and Doly, Nuc. Acids Res. 7, 1513-1523 (1997)] - újraizolálása révén a transzformátumokból kinyerni. Ezt a génbankot a - panD génben mutációt hordozó - *E.coli* DV9 törzs [Vallari and Rock, J. Bacteriol. 164, 136-142 (1985)] kompetens sejtjeibe vittük be elektroporációval. Ehhez kapcsolódóan az elektroporációs réteget a regenerációs fázisban [Tauch, FEMS Microbiol. Lett. 123, 343-347 (1994)] kétszer mostuk E tápoldattal [Vogel and Bonner, J. Biol. Chem. 218, 97-106 (1956)]. Az E tápoldat összetételét az 1. táblázatban mutatjuk be. Ezekkel a sejtekkel 50 ml, 100  $\mu$ g/ml ampicillint tartalmazó E tápoldatot oltottunk be 250 ml-es Erlenmeyer lombikban és levegős rázógépen, 250 ford/perc mellett 39 °C-on inkubáltuk. Kétnapi inkubálás után a baktérium szuszpenziót felhígítottuk és 100  $\mu$ g/ml ampicillinnel kiegészített LB agarra [Lennox, Virology 1, 190 (1955)] kentük ki.



1. táblázat

Táplódat komponens	Literenkénti mennyiség	Megjegyzés
$K_2HPO_4$	10 g	
$NaNH_4HPO_4 \cdot 4 H_2O$	3,5 g	
citromsav	2 g	
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,2 g	
glükóz	4 g	külön sterilizve
tiamin	0,2 $\mu$ g	sterilre szűrve

Izoláltuk egy DV9 transzformátum plazmid DNS-ét, pNIC-1,3 jelöléssel láttuk el és agaróz gélelektroforézissel [Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor (1989)] és ismert hosszúságú standard DNS fragmentumokkal összehasonlítva jellemeztük. A pNIC-1,3 plazmid egy 7 kb hosszúságú inszertumot tartalmaz. pNIC-1,3 komplementációs képességét a panD mutáns DV9 újabb transzformációjával vizsgáltuk meg. A kapott transzformátumok újra képesek voltak  $\beta$ -alanin mentes E táplódatban a fent megadott körülmények közötti növekedésre.

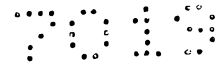
A 7 kb inszertum szubklónozását a pNIC-1,3 plazmidnak restriktív enzimes (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) *Bam*HI, kód: 27-0868-03; *Eco*RI, kód: 27-0884-03; *Bgl*III, kód: 27-0946-02 hasításával és azt követően a megfelelő restriktív emésztéssel előkészített pK18mob vektorba [Schäfer, Gene 145, 69-73 (1994)] történő ligálásával végeztük. A kapott ligációs terméket az *E. coli*

panD mutáns DV9 törzsbe juttattuk be elektroporációval; a komplementképző transzformátumok kiválogatása a fent leírtak szerint történt, ahol az agar lemezek ebben az esetben 50 µg/ml kanamicint tartalmaztak. A komplementet képző egyedi klónokból izoláltuk a plazmidokat és restriktációs analízissel jellemeztük azokat. Egy körülbelül 3 kb nagyságú DNS inszertumot tartalmazó EcoRI szubklónt, amelyet a továbbiakban pNIC-10-nek nevezünk, kiválasztottunk az ezt követő szekvencia analízishez.

## 2. A panD gén szekvenálása

A pNIC-10-ből származó 3 kb fragmentum kétszálú szekvenálásához ezt először különböző restriktációs enzimekkel hasítottuk és a fragmentumokat a pUC19 vagy pK18mob plazmidba szubklónoztuk. A szekvenáláshoz beültetett plazmid DNS-t a „QIAGEN Plasmid Mini Kit (Qiagen, Inc. Chatsworth, CA, USA) segítségével a gyártó utasítása szerint izoláltuk és a plazmid méreteket agaróz gélelektroforézissel határoztuk meg.

A szekvenálást a didezoxi-láncszakítás módszerével végeztük Sanger és munkatársai leírása szerint [Proceedings of the National Academies of Sciences USA 74, 5463-5467 (1977)] Zimmermann módosításával [Nuc. Acids Res. 18, 1067 (1990)]. A „Cy5-AutoRead Sequencing Kit”-et használtuk (Pharmacia Biotech, kód: 27-2690-02, Freiburg, Deutschland). A gélelektroforézissel történő felbontás és a szekvenálási reakció analízise egy „Long Ranger Gel Solution”-poliakrilamid gélben (FMC BioProducts, Rockland, Me., USA) történt egy automatikus lézer-fluoreszcensz (ALF) expressz DNS szekvenáló-



val (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). A kapott durva szekvencia adatokat azután a Staden-Programpaket [Nuc. Acids Res. 14, 217-231 (1986)] 97-0 verzió felhasználásával dolgoztuk fel. A pNIC-10 szubklón összes egyedi szekvenciáját egy összefüggő 3060 bp hosszúságú contig-ba állítottuk össze, amelyet Contig13 jelzéssel láttunk el. Az egész DNS fragmentumnak XNIP számítógépes programmal végzett kódoló terület analízise [Staden Nuc. Acids Res. 14, 217-231 (1986)] 5 nyílt leolvasási keret (open reading frame = ORF) azonosítását eredményezte.

Az 1. ábrán Contig13 restriktív térképét valamint az orf-1-től orf-5-ig jelölt ORF-ek helyzetét mutatjuk be. Homológia analíziseket végeztünk a „BLAST” kereső programmal [Gish and States, Nature of Genetics 3, 266-272 (1993); Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)], amely a „National Library of Medicine” (Bethesda, MD, USA) NCBI szerverének on-line szolgálatán keresztül állt rendelkezésre. Contig13 analízise azt eredményezte, hogy orf-3 a panD gén. A következőkben az orf-3 nyílt leolvasási keretet panD géneként jelöljük. A panD gént hordozó DNS fragmentum nukleotid-szekvenciáját 1. számú szekvenciaként ábrázoljuk. A fenti módszerekkel kapott panD géntermék, nevezetesen az L-aszpartát-1 dekarboxiláz aminosav-szekvenciáját 2. számú szekvenciaként ábrázoljuk.

## 2. példa

**C. glutamicum-ból származó panB és panC gén klónozása és szekvenálása**



## 1. A panB és panC gén klónozása

*C. glutamicum* ATCC13032 törzsből származó kromoszóma DNS-t izoláltunk Schwarzer és Pühler leírása szerint [Bio/Technology 9, 84-87 (1990)] és *Sau3A* restrikciós endonukleázzal hasítottuk. Gélelektroforézissel történő felbontással 3-7 kb illetve 9-20 kb nagyságú DNS fragmentumokat extraháltunk és ezt követően a pBR322 vektor egyedüli *Bam*HI hasítási helyére ligáltuk. A ligációs feltétekkel az *E. coli* DH5 $\alpha$ mc<sup>r</sup> törzset [Grant, Proceedings of the National Academies of Sciences USA 87, 4645-4649 (1990)] transzformáltuk [Hanahan, J. Mol. Biol. 166, 557-580 (1983)]. Az inszertumot hordozó telepeket - tetraciklin érzékenységük segítségével - 10  $\mu$ g/ml tetraciklint tartalmazó LB agarlemezekre történő átoltással azonosítottuk. Plazmid preparációval [Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] az egyesített klónokból 8 csoportot, egyenként 400, 9-20 kb inszertumot tartalmazó plazmiddal és 9 csoportot, egyenként 500, 3-7 kb inszertumot tartalmazó plazmiddal izoláltunk. Az *E. coli* panB mutáns SJ2 törzset [Cronan et al., J. Bacteriol. 149, 916-922 (1982)] czzel a génbankkal, elektroporáció útján [Wehrmann et al., Microbiology 140, 3349-3356 (1994)] transzformáltuk. A transzformátumokat közvetlenül 15 g/l agart tartalmazó CGXII táptalajra [Keilhauer et al., J. Bacteriol. 175, 5595-5603 (1993)] szélesztettük. Azokból a klónokból, amelyek képesek voltak pantotenát kiegészítés nélküli növekedésre, plazmid DNS-t izoláltunk [Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor

Laboratory Press (1989)]. 8 plazmidnál tudtuk újra transzformálás (Retransformation) útján bebizonyítani az *E. coli* mutáns SJ2 törzs panD hiányának heterológ komplementálási képességét.

Ezzel a 8 plazmiddal restriktációs térképezést végeztünk. A vizsgált plazmid vektorok egyike, amelyet a következőkben pUR1-nek nevezünk, tartalmaz egy 9,3 kb inszertumot (2. ábra). *E. coli* panC mutáns DV39 törzs transzformációja [Vallari and Rock, *J. Bacteriol.* 164, 136-142 (1985)] azt eredményezte, hogy a pUR1 vektor szintén képes volt ennek a panC hiányos mutánsnak a komplementálására.

## 2. A panB és panC gének szekvenálása

pUR1-ből származó inszertum egy 2,2 kb nagyságú fragmentumát (2. ábra) Sanger és munkatársai által leírt didezoxi-láncszakítás módszerével [Proceedings of the National Academies of Sciences USA 74, 5463-5467 (1977)] végeztük. Először exonukleáz III-mal szubklónokat hoztunk létre, amelyeket standard primerek (univerzális és reverz primer, Boehringer Mannheim, Deutschland) segítségével szekvenáltunk. A szekvenálási reakció gélelektroforézissel történő analízisét az automatikus lézer-fluoreszcenz (ALF) szekvenálóval (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) végeztük el. A kapott nukleotid-szekvenciát a HUSAR programcsomaggal (Release 4,0, EMBL, Cambridge, GB) analizáltuk. A nukleotid-szekvenciát 3. számú szekvenciaként tesszük közzé. Az analízis 2 nyílt leolvasási keret azonosítását eredményezte. Az egyik nyílt leolvasási keret – amelyet panB génként azonosítottunk – 813 bp hosszúságú és egy 271 aminosavból álló polipeptidet kódol, amely a 4. számú szekvencia. A

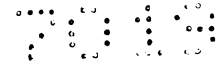


második nyílt leolvasási keret – amelyet panC génként azonosítottunk – 837 bázispárt ölel fel. Ez egy 279 aminosavból álló polipeptidet kódol, amelyet az 5. számú szekvenciában mutatunk be.

### 3. példa

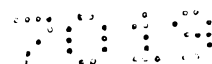
#### **Vektorok összeállítása panD, panBC és panDBC kifejezéséhez**

A *C. glutamicum*-ból és *E. coli*-ból származó, pantotenát bioszintéziséért felelős géneket polimeráz lánc reakcióval (polymerase chain reaction = PCR) valamint szintetikus oligonukleotidokkal megsokszoroztuk (amplifikáltuk). A PCR kísérleteket Taq DNS polimerázzal (Gibco BRL, Eggestein, Deutschland) PCT-100 hőciklus berendezésben (MJ Research Inc., Watertown, Mass., USA) végeztük el. Egyszeri 2 perces 94 °C-on történő denaturálási lépést egy 90 másodperces 94 °C-on történő denaturálási lépés, majd egy 90 másodperces annealing lépés primertől függő hőmérsékleten  $T = (2AT + 4GC) - 5$  °C [Suggs et al., in: Brown D.D. and Fox C.F. (eds.) *Developmental biology using purified genes*, Academic Press, NY, USA 683-693 (1981)], valamint egy 72 °C-on 90 másodpercig tartó extenziós lépés követett. Az utolsó három lépést 35-ször ciklikusan ismételtük és a reakciót egy végső extenziós lépéssel, 10 percig 72 °C-on fejeztük be. Az így megsokszorozott termékeket, miután agaróz gélelektroforézissel megvizsgáltuk azokat, pCR<sup>®</sup>2,1 vektorba (Original TA Cloning Kit, Invitrogene, Leek, Niederlande) ligáltuk a gyártó utasításai szerint és végül az *E. coli* TOP10F' törzsbe transzformáltuk. Transzformátumok kiválogatása 100 µg/ml ampicillint és 40 µg/ml X-Gal-t (5-bróm-4-klór-3-indolil-β-D-galaktozid) tartalmazó LB agar-



lemezeken 37 °C-on 24 órás inkubációval történt.

*C. glutamicum* ATCC13032 törzsből és *E. coli* K12 törzsből [Merkel and Nichols (1993), GenBank: L17086] származó, pantotenát bioszintézisért felelős panD (1. számú szekvencia) és panBC (3. számú szekvencia) gének nukleotid-szekvenciájából kiindulva PCR primereket szintetizáltunk (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland). Ezeket a primereket úgy választottuk meg, hogy a gének sokszorozandó fragmentumait valamint azok natív riboszóma kötőhelyeit tartalmazzák, lehetséges promóter régiókat azonban ne. Kiegészítésként megfelelő restrikciós hasítási helyeket vittünk be, amelyek lehetővé teszik a célvektorba történő klónozást. A PCR primerek szekvenciáit, a hozzáadott hasítási helyeket (aláhúzott szekvenciák), valamint a megsokszorozott gént (fragmentum nagyság bp-ban megadva zárójelben) a következő 2. táblázatban soroljuk fel.



2. táblázat

Primer	Szekvencia restriktációs hasítási hellyel	Termék	Plazmid
panD-Ec1	5' - <u>GAATTC</u> GACAGGGTAGAAAGGTAGA-3' <i>EcoRI</i>	panD <sub>E.c.</sub> (462 bp)	pND-D1
panD-Ec2	5' -AGATCTGGGATAACAATCAAGCAACC-3' <i>BglII</i>		
panD-Cg1	5' -CATCTCACGCTATGAATTCT-3' <i>EcoRI</i>	panD <sub>C.g.</sub> (405 bp)	pND-D2
panD-Cg2	5' -ACGAGGCCTGCAGCAATA-3' <i>PstI</i>		
panBC-E1	5' - <u>GGATCC</u> CACAACATCAATTTATCAGG-3' <i>BamHI</i>	panBC <sub>E.c.</sub> (1700 bp)	pND-BC1
panBC-E2	5' - <u>GGATCC</u> TTAAGTATTACGCCAGCTC-3' <i>BamHI</i>		
panBC-C1	5' - <u>GTCGACT</u> CTGAGCTGGTCATCACATC-3' <i>SalI</i>	panBC <sub>C.g.</sub> (1700 bp)	pND-BC2
panBC-C2	5' - <u>GTCGAC</u> ACGCAGGGTTGGTACTAGAG-3' <i>SalI</i>		

A kifejezéshez bázisvektorként mind *C. glutamicum*-ba, mind *E. coli*-ba a 3. ábrán bemutatott pZ8-1 *E. coli*-*C. glutamicum* inga expressziós vektort (EP 0 375 889 számú európai szabadalmi leírás) ültettük be. Az előzőleg a pCR<sup>®</sup>2,1 vektorba klónozott amplifikátumokat a primerbe inszertált restriktációs hasítási helyek segítségével az ugyanilyen módon kezelt pZ8-1 expressziós vektorba ligáltuk és így az ezen a plazmidon található tac promóter kontrollja alá helyeztük. Egyetlen kivételt képez a panD<sub>E.c.</sub> amplifikátum, itt az

*EcoRI*-*Bgl*III fragmentumot a pZ8-1 vektor kompatibilis *EcoRI*-*Bam*HI restrikciós helyére klónoztuk. Az így előállított expressziós plazmidok mindenkori plazmid jelölését a 2. táblázatban adjuk meg. Az *E. coli*-ból származó,  $\text{panD}_{E.c.}$  gént hordozó pZ8-1 expressziós vektort pND-D1 és a *C. glutamicum*-ból származó,  $\text{panD}_{C.g.}$  gént hordozó pZ8-1 expressziós vektort pND-D2 névvel illetjük. Ennek megfelelően a  $\text{panBC}_{E.c.}$  gént és  $\text{panBC}_{C.g.}$  gént tartalmazó expressziós plazmidoknak pND-BC1 illetve pND-BC2 a neve. Példaként a 3. ábrán a  $\text{panD}_{E.c.}$  és  $\text{panD}_{C.g.}$  gének pZ8-1 vektorba történő klónozási stratégiáját mutatjuk be. A klónozás helyességét minden expressziós plazmidnál a mindenkori inszertum szekvenálásával vizsgáltuk át.

Továbbá mind az *E. coli*, mind a *C. glutamicum*  $\text{panD}$  génekkel összeállítottunk egy mesterséges  $\text{panDBC}$  operont. Az *E. coli* operonhoz a  $\text{panD}_{E.c.}$  gént tartalmazó PCR2,1 vektort *EcoRI*-gyel hasítottuk, a DNS-t agaróz gélen felbontottuk és a  $\text{panD}$  fragmentumot az 1.1. példában leírtak szerint „Nucleotrap Extraction Kit for Nucleic Acids” (Macherey Nagel, Düren, Deutschland) segítségével tisztítottuk meg a gélből. Ezután a fragmentumot az *EcoRI*-gyel hasított pND-BC1 plazmidba ligáltuk. A  $\text{panD}$  gén helyes orientációjával rendelkező plazmidokat azáltal kaptunk, hogy a ligációs keveréket a  $\text{panD}$  auxotróf *E. coli* DV9 törzsbe transzformáltuk, és ezeket az 1. példában leírtak szerint az auxotrófia komplementációjával kiválogattuk. A komplementált mutánsok plazmid DNS-ét izoláltuk és a helyes génelrendeződést a pND-DBC1-nek nevezett plazmid inszertumának szekvenálásával állapítottuk meg (4. ábra).

A *C. glutamicum* panDBC operon összeállításánál hasonlóan jártunk el. A panD<sub>C.g.</sub> gént tartalmazó pCR2,1 vektort *EcoRI*-gyel hasítottuk, miáltal a panD<sub>C.g.</sub> gén egyrészt a primer belsejénél és másrészt a vektor egy *EcoRI* hasítási helyénél kihaladt belőle. Ezt a génfragmentumot tisztítás után *EcoRI*-gyel hasított pZ8-1 vektorba klónoztuk és a helyes panD orientációval rendelkező plazmidot – pND-D4 – a fentiek szerint kaptuk meg és vizsgáltuk át. Ezután a pND-D4 plazmidot *SalI* restrikciós enzimmel (Pharmacia Biotech, kód: 27-0882-01; Freiburg, Deutschland) hasítottuk és a megtisztított panBC fragmentummal – amelyet a pND-BC2 plazmid *SalI* emésztésével kaptunk – ligáltuk. Az elektroporációs keveréket *E. coli* DH5αMCR törzsbe juttattuk be elektroporációval és a panDBC génelrendezéssel rendelkező 10 plazmidot restrikciós analízisekkel derítettük fel. Ezen plazmidok egyikének – amelyet pND-DBC2 névvel jelöltünk (4. ábra) – helyes génelrendeződését szekvencia-analízissel igazoltuk.

A pZ8-1 expressziós vektort valamint az ezen a plazmidon nyugvó pND-D1, pND-D2 és pND-DBC1 szerkezeteket az *E. coli* MG1655 törzsbe transzformáltuk és a transzformátumokat 50 µg/ml kanamicint tartalmazó LB-agaron [Lennox, *Virology* 1, 190 (1955)] válogattuk ki. A kapott törzseket MG1655/pZ8-1, MG1655/pN-D1, MG1655/pND-D2 és MG1655/pND-DBC1 nevekké láttuk el.

A pZ8-1, pND-D1, pND-D2 és pND-DBC2 plazmidoknak *C. glutamicum* ATCC13032 törzsbe történő elektroporációja és azt követő, 25 µg/ml kanamicint tartalmazó LB-agaron [Lennox, *Virology* 1, 190 (1955)] történő kiválogatás után az ATCC13032/pZ8-1, ATCC13032/pND-D1,

ATCC13032/pND-D2 és ATCC13032/pND-DBC2 törzseket kaptuk.

#### 4. példa

##### **Pantotenát képződés különböző *E. coli* K12 törzsekben**

D-pantotenát kvantitatív mérése *Lactobacillus plantarum*-mal végzett pantotenát meghatározás szerint történt (teszt törzs: *Lactobacillus plantarum* ATCC8014, kat. szám: 3211-30-3; tápoldat: Bacto Pantothenate Assay Medium, DIFCO Laboratories, kat. szám: 0604-15-3; Michigan, USA). Ez az indikátor törzs csak pantotenát jelenlétében, a megadott tápoldatban képes szaporodni és növekedése fotometriásan mérhető, lineáris függést mutat a tápoldat pantotenát tartalmával. A kalibrációhoz pantotenát hemikalcium sóját (Sigma, P2250) adtuk a tápoldathoz. Az optikai sűrűséget LKB Biochrom Photometer (Pharmacia Biotech, Freiburg Deutschland) segítségével, 580 nm-en ( $OD_{580}$ ) határoztuk meg.

Az *E. coli* MG1655/pZ8-1, MG1655/pND-D1, MG1655/pND-D2 és MG1655/pND-DBC1 törzsek pantotenát termeléséhez 50 ml teszt tápoldatot (50  $\mu$ g/ml kanamicint tartalmazó Medium E) oltottunk be egy ugyanilyen tápoldatban szaporított 16 órás,  $OD_{580} = 0,1$  sűrűségű tenyészetrel. Ezeknek a tenyészeteknek 5 és 72 órás, 37 °C-on 250 ford/perc mellett történő inkubációját követően a sejteket 10 perces 5000 g centrifugálással pelletáltuk. Az így kapott sejtmentes felülúszót sterilre szűrtük és a pantotenát meghatározásig 4 °C-on tároltuk.

A felülúszó D-pantotenát mennyiségének meghatározását *L. plantarum* ATCC8014 törzsszel végeztük a DIFCO kézikönyv útmutatásai

szerint [DIFCO Manual, Michigan USA, 10th Edition, 1100-1102]. Ezeknek a méréseknek az eredményeit a 3. táblázatban mutatjuk be.

3. táblázat

Törzs	Gén	OD <sub>580</sub> és pantotenát akkumuláció (µg/ml)			
		5 óra		72 óra	
		OD <sub>580</sub>	pantotenát	OD <sub>580</sub>	pantotenát
MG1655/pZ8-1	-	2,0	0,30	2,3	1,47
MG1655/pND-D1	panD <sub>E.c.</sub>	2,3	0,90	2,5	6,95
MG1655/pND-DBC1	panDBC <sub>E.c.</sub>	2,0	0,96	2,0	6,96
MG1655/pND-D2	panD <sub>C.g.</sub>	2,2	4,07	2,3	9,66

### 5. példa

#### Pantotenát képződés különböző *C. glutamicum* törzsekben

A *C. glutamicum* ATCC13032/pZ8-1, ATCC13032/pND-D1, ATCC13032/pND-D2 és ATCC13032/pND-DBC2 törzsekkel történő pantotenát termelést CGXII tápoldatban [Keilhauer et al., J. Bacteriol. 175, 5595-5603 (1993)] (4. táblázat) vizsgáltuk, amelyet előzőleg 25 µg/ml kanamicinnel egészítettünk ki. Ezt a tápoldatot a következőkben *C. glutamicum* teszt tápoldatnak nevezzük. Egyenként 50 ml *C. glutamicum* teszt tápoldatot oltottunk be egy ugyanilyen tápoldatban szaporított 16 órás, OD<sub>580</sub> =0,1 sűrűségű tenyészetrel. Ezeknek a tenyészeteknek 48 órás, 30 °C-on 150 ford/perc mellett történő inkubációját követően a sejteket 10 perces 5000 g centrifu-



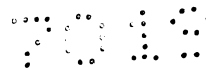
gálással távolítottuk el. A felülúszót sterilre szűrtük és a pantotenát koncentrációt a 4. példában leírtak szerint határoztuk meg. *C. glutamicum* különböző törzseivel kapott pantotenát termelődés eredményeit az 5. táblázatban foglaltuk össze.

4. táblázat

Táploldat komponens	Literenkénti mennyiség	Megjegyzés
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20 g	
karbamid	5 g	
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 g	
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1 g	
$\text{MgSO}_4 * 7 \text{H}_2\text{O}$	0,25 g	
MOPS	42 g	
$\text{CaCl}_2$	10 mg	
$\text{FeSO}_4 * 7 \text{H}_2\text{O}$	10 mg	
$\text{MnSO}_4 * \text{H}_2\text{O}$	10 mg	
$\text{ZnSO}_4 * 7 \text{H}_2\text{O}$	1 mg	
$\text{CuSO}_4$	0,2 mg	
$\text{NiCl}_2 * 6 \text{H}_2\text{O}$	0,02 mg	
biotin	0,5 mg	
glükóz	40 g	külön autoklávözva
protokatechinsav	0,03 mg	sterilre szűrve

5. táblázat

Törzs	Gén	Pantotenát (µg/ml)	
		OD <sub>580</sub>	pantotenát
ATCC13032/pZ8-1	-	21	0,19
ATCC13032/pND-D1	panD <sub>E.c.</sub>	20	0,32
ATCC13032/pND-D2	panD <sub>C.g.</sub>	19	1,78
ATCC13032/pND-DBC2	panDBC <sub>C.g.</sub>	20	2,60

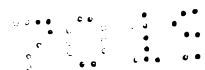


## Szekvenciák jegyzéke

### AZ 1. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

- (i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:  
 (A) HOSSZ: 540 bázispár  
 (B) TÍPUS: nukleotid  
 (C) SZÁLASSÁG: kétszálú  
 (D) TOPOLÓGIA: lineáris
- (ii) MOLEKULATÍPUS: genomiális DNS
- (iii) HIPOTETIKUS: nem
- (iv) ANTISZENZ: nem
- (vi) EREDETI FORRÁS:  
 (A) SZERVEZET: *Corynebacterium glutamicum*  
 (B) TÖRZS: ATCC13032
- (ix) JELLEMZŐK:  
 (A) NÉV/KULCS: CDS  
 (B) ELHELYEZKEDÉS: 77..484  
 (D) EGYÉB INFORMÁCIÓ: /start\_kódon = 77  
                                   /EC\_szám = 4.1.1.11  
                                   /termék = „L-aszpartát-1 dekarboxiláz”  
                                   /gén = „panD”
- (xi) AZ 1. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

AATATTCCTT TCCTTGTCAT CTCACGCTAT GATTTCTAAA ACTTGCAGGA CAACCCCAT	60
AAGGACACCA CAGGAC ATG CTG CGC ACC ATC CTC GGA AGT AAG ATT CAC	109
Met Leu Arg Thr Ile Leu Gly Ser Lys Ile His	
1 5 10	
CGA GCC ACT GTC ACT CAA GCT GAT CTA GAT TAT GTT GGC TCT GTA ACC	157
Arg Ala Thr Val Thr Gln Ala Asp Leu Asp Tyr Val Gly Ser Val Thr	
15 20 25	
ATC GAC GCC GAC CTG GTT CAC GCC GCC GGA TTG ATC GAA GGC GAA AAA	205
Ile Asp Ala Asp Leu Val His Ala Ala Gly Leu Ile Glu Gly Glu Lys	
30 35 40	
GTT GCC ATC GTA GAC ATC ACC AAC GGC GCT CGT CTG GAA ACT TAT GTC	253
Val Ala Ile Val Asp Ile Thr Asn Gly Ala Arg Leu Glu Thr Tyr Val	
45 50 55	
ATT GTG GGC GAC GCC GGA ACG GGC AAT ATT TGC ATC AAT GGT GCC GCT	301
Ile Val Gly Asp Ala Gly Thr Gly Asn Ile Cys Ile Asn Gly Ala Ala	
60 65 70 75	
GCA CAC CTT ATT AAT CCT GGC GAT CTT GTG ATC ATC ATG AGC TAC CTT	349
Ala His Leu Ile Asn Pro Gly Asp Leu Val Ile Ile Met Ser Tyr Leu	
80 85 90	



CAG GCA ACT GAT GCG GAA GCC AAG GCG TAT GAG CCA AAG ATT GTG CAC	397
Gln Ala Thr Asp Ala Glu Ala Lys Ala Tyr Glu Pro Lys Ile Val His	
95 100 105	
GTG GAC GCC GAC AAC CGC ATC GTT GCG CTC GGC AAC GAT CTT GCG GAA	445
Val Asp Ala Asp Asn Arg Ile Val Ala Leu Gly Asn Asp Leu Ala Glu	
110 115 120	
GCA CTA CCT GGA TCC GGG CTT TTG ACG TCG AGA AGC ATT TAGCGTTTAA	494
Ala Leu Pro Gly Ser Gly Leu Leu Thr Ser Arg Ser Ile	
125 130 135	
GCTCGCCAAT ATTGCTGCCG GCCTCGTTGA AAATGGTCAT GGTGGC	540

## A 2. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

- (A) HOSSZ: 136 aminosav
- (B) TÍPUS: aminosav
- (D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) MOLEKULATÍPUS: fehérje

(xi) A 2. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

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



### A 3. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

- (A) HOSSZ: 2164 bázispár
- (B) TÍPUS: nukleotid
- (C) SZÁLASSÁG: kétszálú
- (D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) MOLEKULATÍPUS: genomiális DNS

(iii) HIPOTETIKUS: nem

(iv) ANTISZENZ: nem

(vi) EREDETI FORRÁS:

- (A) SZERVEZET: *Corynebacterium glutamicum*
- (B) TÖRZS: ATCC13032

(ix) JELLEMZŐK:

- (A) NÉV/KULCS: CDS
- (B) ELHELYEZKEDÉS: 351..1163
- (D) EGYÉB INFORMÁCIÓ: /start\_kódon = 351  
/EC\_szám = 4.1.2.12  
/termék = „ketopantoát-hidroxiometil  
transzferáz”  
/gén = „panB”

(ix) JELLEMZŐK:

- (A) NÉV/KULCS: CDS
- (B) ELHELYEZKEDÉS: 1166..2002
- (D) EGYÉB INFORMÁCIÓ: /start\_kódon = 1166  
/EC\_szám = 6.3.2.1  
/termék = „pantotenát szintetáz”  
/gén = „panC”

(xi) A 3. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

```
GCTTCGGGGT ACCAATTCCT TTAAGAACCA TCAGATCAAT CTGTTGTACA TTCTCGGCCA      60
GATTCAGCTT TTCGGTAAGG ACGAAACACT TTCACTGAA TCGGCAGCAA AGTTTCTTAA      120
AGTTTCTAAG GCAACTGCAA CGAGGTATTT TAGAACTCTC CGAGAAATGG AATTAGTTCA      180
CGAGGTCAGC AAACGCCCTT TGCGGTTTGC GCTCACGGAT AAAGGTCGTG AGATAGTAGG      240
TCTTGAGGTA AAAATTTGAC TCCATAACGA GAACTTAATC GAGCAACACC CCTGAACAGT      300
GAATCAAATC GGAATTTATT TATTCTGAGC TGGTCATCAC ATCTATACTC ATG CCC      356
                                     Met Pro
```

ATG	TCA	GGC	ATT	GAT	GCA	AAG	AAA	ATC	CGC	ACC	CGT	CAT	TTC	CGC	GAA	404
Met	Ser	Gly	Ile	Asp	Ala	Lys	Lys	Ile	Arg	Thr	Arg	His	Phe	Arg	Glu	
	140					145					150					
GCT	AAA	GTA	AAC	GGC	CAG	AAA	GTT	TCG	GTT	CTC	ACC	AGC	TAT	GAT	GCG	452
Ala	Lys	Val	Asn	Gly	Gln	Lys	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Ser	Tyr	Asp	Ala	
155					160					165					170	
CTT	TCG	GCG	CGC	ATT	TTT	GAT	GAG	GCT	GGC	GTC	GAT	ATG	CTC	CTT	GTT	500
Leu	Ser	Ala	Arg	Ile	Phe	Asp	Glu	Ala	Gly	Val	Asp	Met	Leu	Leu	Val	
				175					180					185		
GGT	GAT	TCC	GCT	GCC	AAC	GTT	GTG	CTG	GGT	CGC	GAT	ACC	ACC	TTG	TCG	548
Gly	Asp	Ser	Ala	Ala	Asn	Val	Val	Leu	Gly	Arg	Asp	Thr	Thr	Leu	Ser	
			190					195						200		
ATC	ACC	TTG	GAT	GAG	ATG	ATT	GTG	CTG	GCC	AAG	GCG	GTG	ACG	ATC	GCT	596
Ile	Thr	Leu	Asp	Glu	Met	Ile	Val	Leu	Ala	Lys	Ala	Val	Thr	Ile	Ala	
		205					210						215			
ACG	AAG	CGT	GCG	CTT	GTG	GTG	GTT	GAT	CTG	CCG	TTT	GGT	ACC	TAT	GAG	644
Thr	Lys	Arg	Ala	Leu	Val	Val	Val	Asp	Leu	Pro	Phe	Gly	Thr	Tyr	Glu	
	220					225					230					
GTG	AGC	CCA	AAT	CAG	GCG	GTG	GAG	TCC	GCG	ATC	CGG	GTC	ATG	CGT	GAA	692
Val	Ser	Pro	Asn	Gln	Ala	Val	Glu	Ser	Ala	Ile	Arg	Val	Met	Arg	Glu	
235					240					245					250	
ACG	GGT	GCG	GCT	GCG	GTG	AAG	ATC	GAG	GGT	GGC	GTG	GAG	ATC	GCG	CAG	740
Thr	Gly	Ala	Ala	Ala	Val	Lys	Ile	Glu	Gly	Gly	Val	Glu	Ile	Ala	Gln	
				255					260					265		
ACG	ATT	CGA	CGC	ATT	GTT	GAT	GCT	GGA	ATT	CCG	GTT	GTC	GGC	CAC	ATC	788
Thr	Ile	Arg	Arg	Ile	Val	Asp	Ala	Gly	Ile	Pro	Val	Val	Gly	His	Ile	
			270					275						280		
GGG	TAC	ACC	CCG	CAG	TCC	GAG	CAT	TCC	TTG	GGC	GGC	CAC	GTG	GTT	CAG	836
Gly	Tyr	Thr	Pro	Gln	Ser	Glu	His	Ser	Leu	Gly	Gly	His	Val	Val	Gln	
		285					290						295			
GGT	CGT	GGC	GCG	AGT	TCT	GGA	AAG	CTC	ATC	GCC	GAT	GCC	CGC	GCG	TTG	884
Gly	Arg	Gly	Ala	Ser	Ser	Gly	Lys	Leu	Ile	Ala	Asp	Ala	Arg	Ala	Leu	
	300					305					310					
GAG	CAG	GCG	GGT	GCG	TTT	GCG	GTT	GTG	TTG	GAG	ATG	GTT	CCA	GCA	GAG	932
Glu	Gln	Ala	Gly	Ala	Phe	Ala	Val	Val	Leu	Glu	Met	Val	Pro	Ala	Glu	
315					320					325					330	
GCA	GCG	CGC	GAG	GTT	ACC	GAG	GAT	CTT	TCC	ATC	ACC	ACT	ATC	GGA	ATC	980
Ala	Ala	Arg	Glu	Val	Thr	Glu	Asp	Leu	Ser	Ile	Thr	Thr	Ile	Gly	Ile	
				335					340					345		
GGT	GCC	GGC	AAT	GGC	ACA	GAT	GGG	CAG	GTT	TTG	GTG	TGG	CAG	GAT	GCC	1028
Gly	Ala	Gly	Asn	Gly	Thr	Asp	Gly	Gln	Val	Leu	Val	Trp	Gln	Asp	Ala	
			350					355						360		
TTC	GGC	CTC	AAC	CGC	GGC	AAG	AAG	CCA	CGC	TTC	GTC	CGC	GAG	TAC	GCC	1076
Phe	Gly	Leu	Asn	Arg	Gly	Lys	Lys	Pro	Arg	Phe	Val	Arg	Glu	Tyr	Ala	
		365					370						375			
ACC	TTG	GGC	GAT	TCC	TTG	CAC	GAC	GCC	GCG	CAG	GCC	TAC	ATC	GCC	GAT	1124
Thr	Leu	Gly	Asp	Ser	Leu	His	Asp	Ala	Ala	Gln	Ala	Tyr	Ile	Ala	Asp	
	380					385						390				

ATC Ile 395	CAC His	GCG Ala	GGT Gly	ACC Thr	TTC Phe	CCA Pro	GGC Gly	GAA Glu	GCG Ala	GAG Glu	TCC Ser	TTT Phe	TA Met	ATG Gln	CAG Gln	1171
					400					405				1		
GTA Val	GCA Ala	ACC Thr	ACA Thr	AAG Lys	CAG Gln	GCG Ala	CTT Leu	ATC Ile	GAC Asp	GCC Ala	CTC Leu	CTC Leu	CAC His	CAC His	AAA Lys	1219
		5					10					15				
TCC Ser	GTC Val	GGG Gly	CTC Leu	GTC Val	CCC Pro	ACC Thr	ATG Met	GGT Gly	GCG Ala	CTA Leu	CAC His	AGC Ser	GGA Gly	CAC His	GCC Ala	1267
	20					25					30					
TCG Ser	TTG Leu	GTT Val	AAA Lys	GCA Ala	GCA Ala	CGC Arg	GCT Ala	GAA Glu	AAC Asn	GAC Asp	ACT Thr	GTT Val	GTA Val	GCC Ala	AGT Ser	1315
	35				40					45					50	
ATT Ile	TTT Phe	GTC Val	AAT Asn	CCC Pro	CTG Leu	CAG Gln	TTT Phe	GAA Glu	GCA Ala	CTC Leu	GGT Gly	GAT Asp	TGC Cys	GAT Asp	GAT Asp	1363
				55					60					65		
TAC Tyr	CGC Arg	AAC Asn	TAT Tyr	CCC Pro	CGC Arg	CAA Gln	CTC Leu	GAC Asp	GCC Ala	GAT Asp	TTA Leu	GCA Ala	CTG Leu	CTT Leu	GAA Glu	1411
			70					75					80			
GAG Glu	GCA Ala	GGT Gly	GTG Val	GAT Asp	ATT Ile	GTG Val	TTC Phe	GCA Ala	CCC Pro	GAT Asp	GTG Val	GAG Glu	GAA Glu	ATG Met	TAC Tyr	1459
		85					90					95				
CCC Pro	GGT Gly	GGC Gly	TTG Leu	CCA Pro	CTA Leu	GTG Val	TGG Trp	GCG Ala	CGC Arg	ACC Thr	GGT Gly	TCC Ser	ATC Ile	GGA Gly	ACA Thr	1507
	100					105					110					
AAA Lys	TTG Leu	GAG Glu	GGT Gly	GCC Ala	AGC Ser	AGG Arg	CCT Pro	GGC Gly	CAT His	TTC Phe	GAT Asp	GGT Gly	GTG Val	GCT Ala	ACC Thr	1555
	115				120					125					130	
GTG Val	GTG Val	GCG Ala	AAG Lys	CTG Leu	TTC Phe	AAT Asn	TTG Leu	GTG Val	CGC Arg	CCT Pro	GAT Asp	CGT Arg	GCA Ala	TAT Tyr	TTT Phe	1603
				135					140					145		
GGA Gly	CAA Gln	AAA Lys	GAT Asp	GCT Ala	CAG Gln	CAG Gln	GTT Val	GCG Ala	GTG Val	ATT Ile	CGG Arg	CGA Arg	TTG Leu	GTT Val	GCC Ala	1651
			150					155					160			
GAT Asp	CTA Leu	GAC Asp	ATT Ile	CCC Pro	GTG Val	GAG Glu	ATT Ile	CGT Arg	CCC Pro	GTT Val	CCG Pro	ATT Ile	ATT Ile	CGT Arg	GGC Gly	1699
		165				170						175				
GCC Ala	GAT Asp	GGC Gly	TTA Leu	GCC Ala	GAA Glu	TCC Ser	AGC Ser	CGC Arg	AAT Asn	CAA Gln	CGT Arg	CTT Leu	TCT Ser	GCG Ala	GAT Asp	1747
	180					185					190					
CAG Gln	CGA Arg	GCG Ala	CAA Gln	GCT Ala	CTG Leu	GTG Val	CTG Leu	CCG Pro	CAG Gln	GTG Val	TTG Leu	AGT Ser	GGG Gly	TTG Leu	CAG Gln	1795
	195				200					205				210		
CGT Arg	CGA Arg	AAA Lys	GCA Ala	GCT Ala	GGT Gly	GAA Glu	GCG Ala	CTA Leu	GAT Asp	ATC Ile	CAA Gln	GGT Gly	GCG Ala	CGC Arg	GAC Asp	1843
			215						220					225		
ACC Thr	TTG Leu	GCC Ala	AGC Ser	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	GTG Val	CGC Arg	TTG Leu	GAT Asp	CAC His	CTG Leu	GAA Glu	ATT Ile	GTC Val	1891
			230					235					240			
GAT Asp	CCA Pro	GCC Ala	ACC Thr	CTC Leu	GAA Glu	CCA Pro	TTA Leu	GAA Glu	ATC Ile	GAC Asp	GGC Gly	CTG Leu	CTC Leu	ACC Thr	CAA Gln	1939
		245					250					255				

CCA GCG TTG GTG GTC GGC GCG ATT TTC GTG GGG CCG GTG CGG TTG ATC 1987  
 Pro Ala Leu Val Val Gly Ala Ile Phe Val Gly Pro Val Arg Leu Ile  
 260 265 270

GAC AAT ATC GAG CTC TAGTACCAAC CCTGCGTTGC AGCACGCAGC TTCGCATAAC 2042  
 Asp Asn Ile Glu Leu  
 275

GCGTGCTCAG CTCAGTGTTT TTAGGTGCGC GGTGCGGATC GGAACCGGGA GTTGCCACT 2102

GCGGTGGCGT GGCCTCACCC GACAGCGCCC ATGCCGCCTG ACGAGCTGCA CCAACGCCA 2162

CA 2164

#### A 4. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

- (A) HOSSZ: 271 aminosav
- (B) TÍPUS: aminosav
- (D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) MOLEKULATÍPUS: fehérje

(xi) A 4. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Met Pro Met Ser Gly Ile Asp Ala Lys Lys Ile Arg Thr Arg His Phe  
 1 5 10 15

Arg Glu Ala Lys Val Asn Gly Gln Lys Val Ser Val Leu Thr Ser Tyr  
 20 25 30

Asp Ala Leu Ser Ala Arg Ile Phe Asp Glu Ala Gly Val Asp Met Leu  
 35 40 45

Leu Val Gly Asp Ser Ala Ala Asn Val Val Leu Gly Arg Asp Thr Thr  
 50 55 60

Leu Ser Ile Thr Leu Asp Glu Met Ile Val Leu Ala Lys Ala Val Thr  
 65 70 75 80

Ile Ala Thr Lys Arg Ala Leu Val Val Val Asp Leu Pro Phe Gly Thr  
 85 90 95

Tyr Glu Val Ser Pro Asn Gln Ala Val Glu Ser Ala Ile Arg Val Met  
 100 105 110

Arg Glu Thr Gly Ala Ala Ala Val Lys Ile Glu Gly Gly Val Glu Ile  
 115 120 125

Ala Gln Thr Ile Arg Arg Ile Val Asp Ala Gly Ile Pro Val Val Gly  
 130 135 140

His Ile Gly Tyr Thr Pro Gln Ser Glu His Ser Leu Gly Gly His Val  
 145 150 155 160

Val Gln Gly Arg Gly Ala Ser Ser Gly Lys Leu Ile Ala Asp Ala Arg  
 165 170 175

Ala Leu Glu Gln Ala Gly Ala Phe Ala Val Val Leu Glu Met Val Pro  
 180 185 190

Ala Glu Ala Ala Arg Glu Val Thr Glu Asp Leu Ser Ile Thr Thr Ile  
 195 200 205

Gly Ile Gly Ala Gly Asn Gly Thr Asp Gly Gln Val Leu Val Trp Gln  
 210 215 220

Asp Ala Phe Gly Leu Asn Arg Gly Lys Lys Pro Arg Phe Val Arg Glu  
225 230 235 240

Tyr Ala Thr Leu Gly Asp Ser Leu His Asp Ala Ala Gln Ala Tyr Ile  
245 250 255

Ala Asp Ile His Ala Gly Thr Phe Pro Gly Glu Ala Glu Ser Phe  
260 265 270

#### AZ 5. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZ: 279 aminosav

(B) TÍPUS: aminosav

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) MOLEKULATÍPUS: fehérje

(xi) AZ 5. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Met Gln Val Ala Thr Thr Lys Gln Ala Leu Ile Asp Ala Leu Leu His  
1 5 10 15

His Lys Ser Val Gly Leu Val Pro Thr Met Gly Ala Leu His Ser Gly  
20 25 30

His Ala Ser Leu Val Lys Ala Ala Arg Ala Glu Asn Asp Thr Val Val  
35 40 45

Ala Ser Ile Phe Val Asn Pro Leu Gln Phe Glu Ala Leu Gly Asp Cys  
50 55 60

Asp Asp Tyr Arg Asn Tyr Pro Arg Gln Leu Asp Ala Asp Leu Ala Leu  
65 70 75 80

Leu Glu Glu Ala Gly Val Asp Ile Val Phe Ala Pro Asp Val Glu Glu  
85 90 95

Met Tyr Pro Gly Gly Leu Pro Leu Val Trp Ala Arg Thr Gly Ser Ile  
100 105 110

Gly Thr Lys Leu Glu Gly Ala Ser Arg Pro Gly His Phe Asp Gly Val  
115 120 125

Ala Thr Val Val Ala Lys Leu Phe Asn Leu Val Arg Pro Asp Arg Ala  
130 135 140

Tyr Phe Gly Gln Lys Asp Ala Gln Gln Val Ala Val Ile Arg Arg Leu  
145 150 155 160

Val Ala Asp Leu Asp Ile Pro Val Glu Ile Arg Pro Val Pro Ile Ile  
165 170 175

Arg Gly Ala Asp Gly Leu Ala Glu Ser Ser Arg Asn Gln Arg Leu Ser  
180 185 190

Ala Asp Gln Arg Ala Gln Ala Leu Val Leu Pro Gln Val Leu Ser Gly  
195 200 205

Leu Gln Arg Arg Lys Ala Ala Gly Glu Ala Leu Asp Ile Gln Gly Ala  
210 215 220



## Ábrák

A következő ábrákat mellékeljük:

1. ábra: Contig13 térképe orf-1-től orf-5-ig
2. ábra: a pUR1 által tartalmazott klónozott DNS fragmentum térképe és a szekvenált DNS darabok helyzetének megadása
3. ábra: a pZ8-1, pND-D1 és pND-D2 plazmidok térképe
4. ábra: a pND-DBC1 és pND-DBC2 plazmidok térképe

Az ábrákon alkalmazott rövidítések jelentése a következő:

rrnBT1T2: az *rrnB* gén transzkripció terminátora

Ptac: tac promóter

panB: a *panB* gén kódoló régiója

panC: a *panC* gén kódoló régiója

panD: a *panD* gén kódoló régiója

rep-C.g.: *C. glutamicum*-ban történő replikációért felelős DNS régió

oriV-E.c.: vegetatív transzfer eredője *E. coli*-ban

kan: kanamicin rezisztencia

EcoRI: az *EcoRI* restrikciós enzim hasítási helye

E: az *EcoRI* restrikciós enzim hasítási helye

BamHI: a *BamHI* restrikciós enzim hasítási helye

B: a *BamHI* restrikciós enzim hasítási helye

BglII: a *BglII* restrikciós enzim hasítási helye

ClaI: a *ClaI* restrikciós enzim hasítási helye

H: a *HindIII* restrikciós enzim hasítási helye

NcoI: az *NcoI* restrikciós enzim hasítási helye

NruI: az *NruI* restrikciós enzim hasítási helye

NsiI: az *NsiI* restrikciós enzim hasítási helye

P: a *PstI* restrikciós enzim hasítási helye

PstI: a *PstI* restrikciós enzim hasítási helye

PvuI: a *PvuI* restrikciós enzim hasítási helye

SacI: *SacI* restrikciós enzim hasítási helye

SalI: *SalI* restrikciós enzim hasítási helye

ScaI: *ScaI* restrikciós enzim hasítási helye

SphI: *SphI* restrikciós enzim hasítási helye

X: *XbaI* restrikciós enzim hasítási helye

XhoI: *XhoI* restrikciós enzim hasítási helye

## S Z A B A D A L M I I G É N Y P O N T O K

1. Mikroorganizmusokban, *Corynebacterium* és *Escherichia* nemzetségekben replikálódni képes, adott esetben rekombináns DNS, amely aszpartát-1 dekarboxilázt kódoló nukleotid-szekvenciát tartalmaz.

2. Az 1. igénypont szerinti, replikációra képes DNS, amelynek nukleotid-szekvenciája *Corynebacterium* eredetű, az 1. ábrán bemutatott helyzetű panD-t kódol.

3. A 2. igénypont szerinti, replikációra képes DNS, amelynek

- i) panD-t kódoló nukleotid-szekvenciáját az 1. számú szekvencia mutatja; vagy
- ii) szekvenciája a genetikai kód degeneráltságán belül megfelel az i) szekvenciának; vagy
- iii) szekvenciája az i) vagy ii) szekvenciával komplementer szekvenciával hibridizál és adott esetben
- iv) szekvenciája i)-ben működés semleges szenz mutációkat tartalmazó szekvencia.

4. Mikroorganizmusok – különösen a *Corynebacterium* vagy *Escherichia* nemzetségből – amelyeket az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti, replikációra képes DNS bevezetésével transzformáltunk.

5. pND-D2 plazmid vektor, amelynek ismertetőjelei a 2. ábrán bemutatott restriktációs térképen láthatók és amelyet *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032/pND-D2-ként DSM 12438 jelöléssel helyeztünk letétbe.

6. pND-DBC2 plazmid vektor, amelynek ismertetőjelei a 4. ábrán bemutatott restriktációs térképen láthatók és amelyet *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032/pND-DBC2-ként DSM 12437 jelöléssel helyeztünk letétbe.

7. Eljárás D-pantoténsav előállítására, azzal jellemezve, hogy mikroorganizmusokban felerősítjük (fokozottan kifejezzük) a panD gént és adott esetben további, az aszpartát-1 dekarboxiláz kódolásáért felelős nukleotid-szekvenciákat, és ezeket a mikroorganizmusokat fermentációval szaporítjuk.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a felerősítés eléréséhez a gén illetve nukleotid-szekvenciák másolatainak számát úgy növeljük meg, hogy mikroorganizmusokat transzformálunk ezt a gént illetve nukleotid-szekvenciákat hordozó plazmid vektorokkal vagy kromoszómális sokszorozást (amplifikációt) végzünk.

9. A 7. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a fokozott kifejeződés eléréséhez a struktúrgéntől felfelé (upstream) elhelyezkedő promóter és szabályozó régióban mutációt végzünk.

10. A 7. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a fokozott kifejeződés eléréséhez a struktúrgéntől felfelé (upstream) expressziós kazettákat építünk be.

11. A 7. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a panD gén kifejeződését a mikroorganizmusokban a megfelelő m-RNS élettartamának meghosszabbításával és/vagy az ehhez tartozó enzimfehérjék lebomlásának megakadályozásával javítjuk.

12. A 8-11. igénypontok szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a panD gént olyan mikroorganizmusokban fejezzük ki felerősítve, amelyek további metabolit illetve antimetabolit rezisztenciával rendelkeznek.

13. A 8-12. igénypontok szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a fokozott kifejeződéshez a mikroorganizmusokat megváltoztatott szaporító tápoldatokban fermentáljuk és/vagy a fermentáció körülményeit változtatjuk meg.

14. A 8-13. igénypontok szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan mikroorganizmusokat alkalmazunk, amelyekben a pantotenát (pantoténsav) képződést csökkentő anyagcsere útvonalakat legalább részben kiiktattuk.

15. A 8-14. igénypontok szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan mikroorganizmusokat alkalmazunk, amelyekben a panD génen kívül a pantoténsav anyagcsere egyéb génjeit egyenként vagy együttesen felerősítettük (fokozottan kifejeztük).

16. A 15. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan mikroorganizmusokat alkalmazunk, amelyekben a *Corynebacterium* eredetű panD génen kívül a ketopantoát-hidroximetil transzferáz (EC 4.1.2.12) és pantotenát szintetáz (EC 6.3.2.1) enzimeket kódoló egy vagy több gént felerősítettünk (fokozottan kifejeztünk).

17. A 15. és 16. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy különböző kompatibilis, a nevezett géneket egyenként tartalmazó plazmid vektorokkal transzformált mikroorganizmusokat alkalmazunk.

18. A 15. és 16. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy egy plazmid vektorral transzformált törzset alkalmazunk és a plazmid vektor a nevezett gének közül – beleértve a panD gént – egyet vagy többet hordoz, ahol a gének egymás után elrendezve közös promóter kontrollja alatt, vagy egymástól elválasztva, különböző promóterek kontrollja alá rendezve helyezkednek el.

19. A 17. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy pND-D2 plazmid vektorral transzformált mikroorganizmusokat alkalmazunk.

20. A 17. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy pND-DBC2 plazmid vektorral transzformált mikroorganizmusokat alkalmazunk.

21. Eljárás pantoténsav előállítására, azzal jellemezve, hogy a következő lépéseket végezzük:

a) mikroorganizmusok fermentációját egy vagy több, az előzőekben leírt igénypont szerint, amelyben legalább a panD gént – adott esetben a panB és/vagy panC génnel kombináltan – felerősítve fejezzük ki;

b) a pantoténsav feldúsítását a tápoldatban vagy a mikroorganizmusok sejtjeiben; és

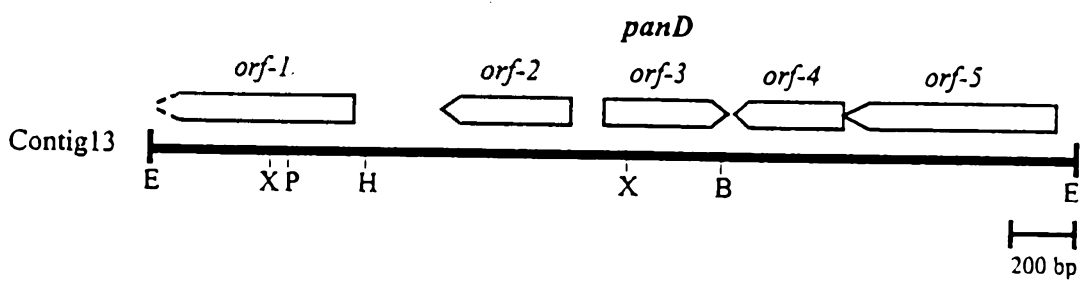
c) pantoténsav izolálását.

22. A 21. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a fokozottan kifejezett gének a *Corynebacterium* nemzetségbe tartozó mikroorganizmusokból származnak.

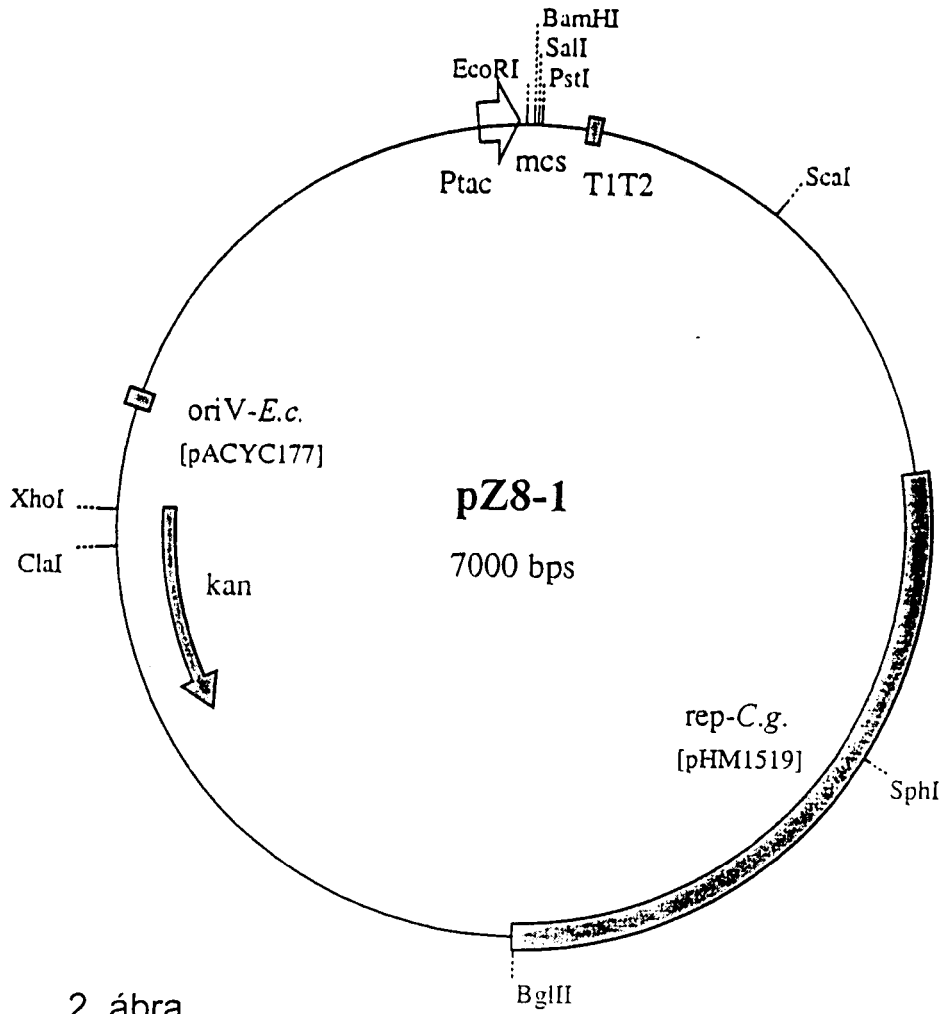
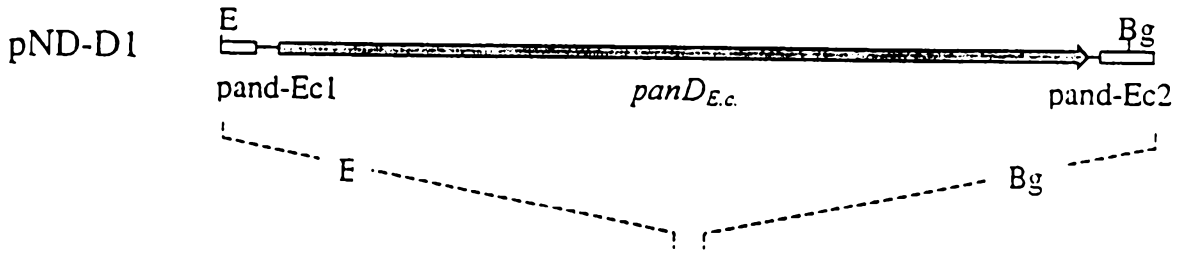
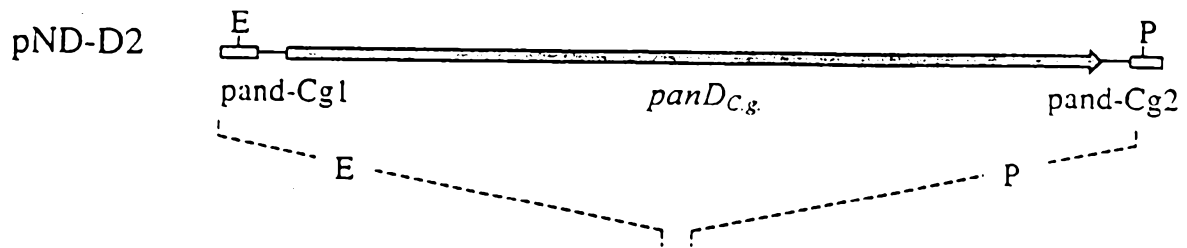
23. A 21. vagy 22. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemez-



# KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

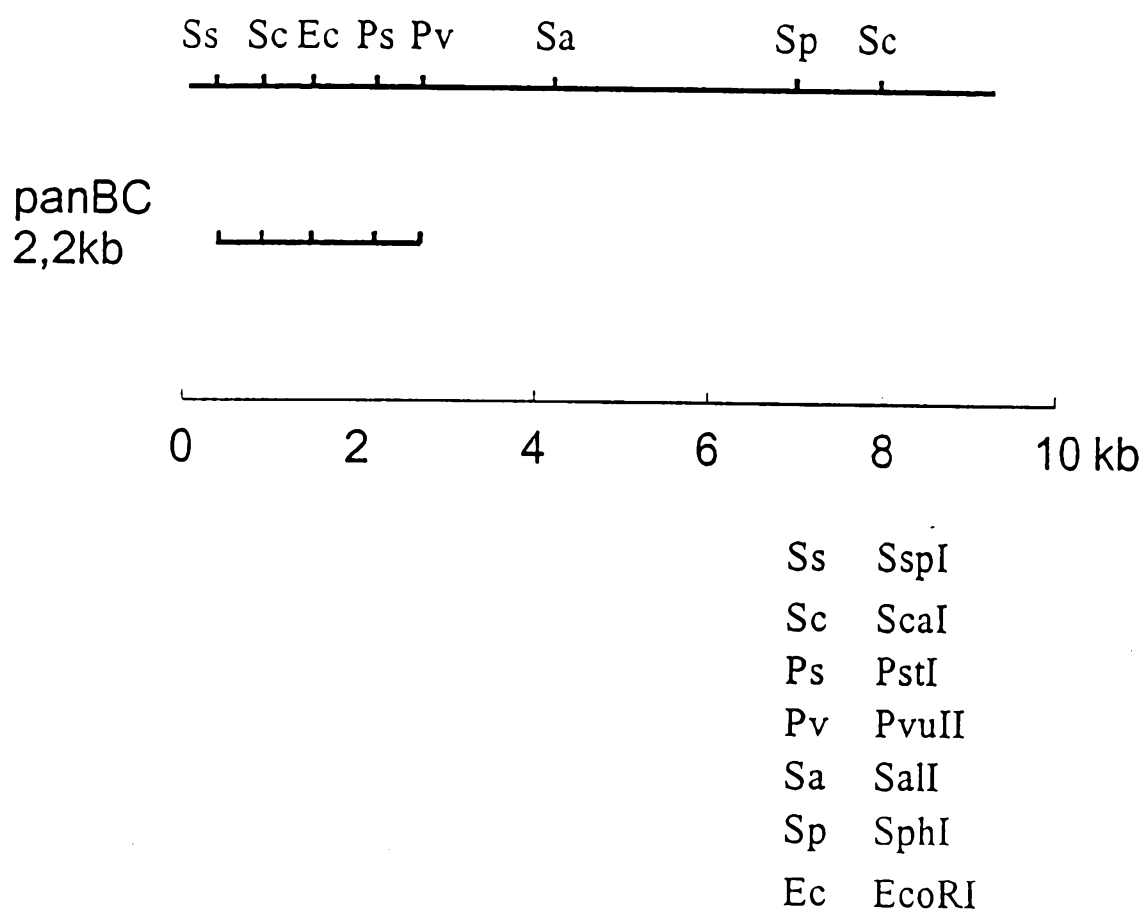


1. ábra



2. ábra

3. ábra



4. ábra

