(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 38 56 558 T2** 2004.04.29

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 589 205 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **P 38 56 558.7**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **93 113 193.2**
(96) Europäischer Anmeldetag: **14.04.1988**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **30.03.1994**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **25.06.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **29.04.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 15/52**
C12N 1/21, C12P 19/06

(30) Unionspriorität:
38302 14.04.1987 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL, SE

(73) Patentinhaber:
Shin-Etsu Chemical Co., Ltd., Tokio/Tokyo, JP;
Shin-Etsu Bio Inc., San Diego, Calif., US

(72) Erfinder:
Pollock, Thomas J., San Diego, California 92122, US; Thorne, Linda, Palomar, California 92060, US

(74) Vertreter:
Eisenführ, Speiser & Partner, 28195 Bremen

(54) Bezeichnung: **Herstellung von Xanthan-Gummi mittels Xanthomonas campestris mit Genen zur hydrolisierung von Laktose integriert im Chromosom.**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft die Synthese von Xanthangummi mit Xanthomonas campestris und insbesondere Verfahren zur Verbesserung der Synthese durch Modifikation des natürlichen Organismus.

[0002] Eine Anzahl von Mikroorganismen produzieren extrazelluläre Polysaccharide, die auch als Exopolysaccharide oder EPS bekannt. Das als Xanthan bekannte Exopolysaccharid wird vom Bakterium Xanthormonas campestris produziert. Der Stamm X. camestris pv campestris ist ein direkter Auslöser von Schwarzfäulnis bei Kruziferen.

[0003] Xanthan selbst ist geeignet als ein Spezialitätenpolymer für eine wachsende Anzahl von wirtschaftlichen Anwendungen. Der Einsatz von Xanthan als Handelsprodukt ist ein Ergebnis von erfolgreichen Screening Bemühungen des Northern Regional Research Center, geeignete wasserlösliche Polysaccharidprodukte zu finden, um existierende Gummen aus Pflanzen und Algen zu ersetzen. Das NRRL X. campestris NRRL B1459, ein Stamm, der ein Polymer produziert, welches drei wünschenswerte Eigenschaften hat: (1) hohe Viskosität bei niedriger Konzentration; (2) Pseudoplastizität und (3) Unempfindlichkeit gegen eine großen Bereich der Temperatur, des pH-Wertes und der Elektrolytkonzentration. Aufgrund seiner speziellen biologischen Eigenschaften wird Xanthan in Lebensmitteln, Kosmetika, Pharmazeutika, Papier, Lacken, Textilien und Klebstoffen sowie darüber hinaus in der Öl- und Gasindustrie eingesetzt. Außerdem ist das Polymer in einfacher Weise durch Fermentation aus D-Glucose herzustellen. Die Synthese von Xanthan ist vermutlich ähnlich der Synthese von Exopolysacchariden durch Gram-negative Bakterien wie zum Beispiel die Spezien Rhizobium, Pseudomonas, Klebsiella und Escherichia. Der Gang der Synthese kann in drei Teile eingeteilt werden: (1) Aufnahme von einfachen Zuckern und deren Umwandlung in nukleotide Derivate; (2) den Zusammenbau von anhängenden Pentasacchariduntereinheiten an einem Isopentylpyrophosphatträger und (3) die Polymerisation von Pentasaccharid Wiederholungseinheiten und deren Sekretion. Der Vergleich mit einem fortgeschrittenen molekulargenetischen Verständnis der Synthese von Colansäure mit E. coli oder der Synthese von Alginate mit P. aeruginosa ergab wenig Wissen über die Gene, Enzyme oder Mechanismen, die die Synthese von Xanthan durch X. campestris steuern.

[0004] Xanthangummi wird normalerweise hergestellt durch Fermentation von X. campestris mit Glucose oder Maisöl als Hauptkohlenstoffquelle. Obwohl es auch möglich ist, die Glucose und Galactose in hydrolierter Käsemolke in Xanthan zu überführen, nutzen wilde Stämme von X. campestris Lactose nur in geringem Umfang, und die Molke muss zuerst enzymatisch mit Lactose oder β-Galactosidase hydolysiert werden. Es gibt einige Vorschläge, dass die β-Galactosidase von X. campestris eine niedrige Affinität zu Lactose hat, wodurch die geringe Utilisierung von unhydrolyzierter Lactose erklärt wird. Es wurden Versuche angestellt, einen Stamm von X. campestris herzustellen, der Lactose besser utilisiert. Exogene lac-Gene wurden in X. campestris überführt, wobei Transposon Tn951 eingesetzt wurde, welches wiederum in das mobilisierbare Plasmid RP1 mit breitem Wirtsbereich eingefügt wurde. Jedoch waren das Plasmid und deshalb die lac-Gene in Abwesenheit eines plasmidselektiven Antibiotikums nicht stabil: (Walsh et al. Appl. Environ. Microbiol., 1984, 47(2): 253-25). Bei anderen Untersuchungen wurde ein spontanes Derivat von X. compestris B1459 isoliert, welches unhydrolysierte Lactose in Molke zu Xanthangummi umwandeln konnte. Jedoch war die Natur der Mutation unbekannt; der Stamm erwies sich für die Xanthanproduktion als nicht stabil und verlor innerhalb von vierzig Generationen unter nicht selektierenden Bedingungen beträchtlich an Produktivität.

[0005] Andere genetische Manipulationen von X. compestris sind wünschenswert. Beispielsweise werden mitunter unerwünschte Enzyme produziert, die das Xanthanprodukt verunreinigen und die Eignung von Xanthangummi auf mehr einengen als es sonst möglich wäre.

[0006] Dementsprechend wäre ein besseres Verständnis der genetischen Kontrolle der Xanthanproduktion durch X. campestris nützlich, um die Produktivität von X. campestris bei der Xanthanproduktion zu verbessern.

[0007] Eine neuere Arbeit über das molekulare Klonieren von Genen umfasste die Produktion von Xanthan (Barrere et al., Int. J. Biol. Macromol. (1986) 8: 372–374). Eine Studie zeigte, dass eine Mutation, die die Synthese von Exopolysaccharid blockiert und die Nodulation von Erbsen mit Rizobium leguminsarum verhinderte, durch klonierte DNA aus dem Phytopathogen Xanthomonas korrigiert wurde, siehe Borthakur et al., Mol. Gen. Genet. (1986) 203: 320–323. Die Produktion von Xanthan mit Xanthomonas campestrist, die Eigenschaften von Xanthan und wirtschaftliche Anwendungen von Xanthan werden bestreben in Rogovin et al., J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng. (1961) 3: 51–63 und Kennedy et al., 1984, "Production, properties, and applications of xanthan", Seiten 319–371 in M. E. Bushell (Hrsg.), Progress in Industrial Microbiology, Band 19, Elsevier, Amsterdam.

[0008] Nach der Einreichung der US-Anmeldung mit der Serial Number 038 302 am 14. April 1987 sind eine Reihe von Arbeiten erschienen. Diese umfassen Harding et al., J. Bacteriol. (1987) 169: 2854–2861, der die genetischen und Physikalischen Analysen eines Genklusters beschreibt, welches für die Biosynthese von Xanthangummi in X. campestris wesentlich ist. Die europäische Patentanmeldung EP 0 233 019 A2 (eingereicht am 29. Januar 1987) beschreibt ein rekombinantes DNA-Plasmid für die Synthese von Xanthangummi. Thorne et al., J. Bacteriol. (1987) 169: 3593–3600 beschreibt das Kluster von Mutationen, die die Synthese von Xan-

thangummi durch X. campestris blockieren.

[0009] Die Erfindung stellt ein Verfahren zu Verbesserung der Produktion von Xanthangummi zur Verfügung, bei dem in einem Kulturmedium ein Xanthomonas campestris-Stamm kultiviert wird, der eine Xanthan erhöhende Modifikation aufweist, wobei die Modifikation eine exprimierbare exogene genetische Information ist, die die Synthese von Xanthan steuert und bei dem Xanthan aus dem Kulturmedium entfernt wird. Es wird ein Abschnitt der chromosomalen DNA von Xanthomonas ist identifiziert, der die genetische Information enthält, die die Synthese von Xanthan steuert; dieser erlaubt den Einsatz zahlreicher Arbeitsverfahren für die Erhöhung der Xanthanproduktion, beispielsweise liefert gibt er durch die Wirkung einer Dosierung Mehrfachkopien zur Verbesserung der Xanthanproduktion und einen indizierbaren Promoter oder ein anderes Verfahren der genetischen Steuerung, um die Xanthanproduktion von der konstitutiven Proteinsynthese zu entkoppeln.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

[0010] Die nachfolgende Beschreibung von speziellen Aufführungsformen dient dem besseren Verständnis der Erfindung und ist zusammen mit den beigefügten Zeichnungen zu betrachten, die einen Teil der Beschreibung bilden; es zeigen:

[0011] **Fig.** 1: eine Zusammenstellung von drei körperlichen Karten für Insertionen der X. campestris-DNA in den Vektor pRK311, der Komlementierungsgruppen zeigt. Die mit "R/H" bezeichnete Linie zeigt die Reihenfolge und Position von Restriktionsschnittstellen für EcoRI und HindIII-Enyzmen, die aus den überlappenden Karten abgeleitet wurden, die für individuelle klonierte Inserts erhalten wurden. Klammern ( ) am Ende der klonierten Karten zeigen, dass es nicht möglich war, ein Ende, welches durch Schnitt innerhalb des klonierten Inserts erzeugt war, von dem Schnitt in der benachbarten mehrfachen Klonierungsstelle zu unterscheiden. Die Positionen der Abmessungskarte für Xgs-Mutationen sind oberhalb der körperlichen Karten angegeben. Ungeordnete loci werden von geschweiften Klammern, { }, eingeschlossen.

[0012] **Fig.** 2: einen Graphen, der den zeitlichen Verlauf der Akkumulation von Xanthan durch wilde Stämme X59 zeigt, die Mehrfachkopien der genetischen Information tragen, die die Synthese von Xanthan steuert. Rekombinante Plasmide, die Inserts geklonter X. compestris-DNA enthalten, die die Xanthansynthese wiederherstellen, sind durch folgende Symbole angegeben: • S59; Δ X59pRK311; ▲ X59c45; □ X59c9, o X59c1; ■ X59c31. Darstellung A zeigt die optische Dichte bei unterschiedlichen Zeiten des Zellwachstums, wogegen Darstellung B die Akkumulation von Xanthan zeigt. Die obere Kurve in Darstellung A repräsentiert vier Kulturen. In Darstellung B bedeutet die ausgezogene Linie X59c45, die gestrichelte X59pRK311 und die gepunktete X59c31.

[0013] **Fig.** 3: eine Restriktionskarte, die die subklonierten Fragmente des c8-Fragments der in **Fig.** 1 dargestellten X. campestris-DNA zeigt. Abkürzungen: B Bam-HI; BgI BgIII; H HindIII; R EcoRI.

[0014] **Fig.** 4: einen Graphen mit vier Darstellungen, die vier unterschiedliche Kurven von drei Kontrollkonturen im Vergleich zu einem gegen Rifampicin unempfindlichen Stamm, X59.

[0015] **Fig.** 5: eine schematisches Diagramm, welches die Konstruktion eines Lac^+-Integrationsvektors zeigt. Die kreisförmigen genetischen Karten sind ungefähr maßstabsgerecht. Das Plasmid pSY1181 ist eine Integrationsvektor für den allgemeinen Einsatz und trägt einen DNA-Segment (c1), welches identisch mit der Chromosonaensequenz von X. campestris ist. Das Plasmid pSY1232 trägt zusätzlich die lac-Gene von Tn951.

[0016] **Fig.** 6 Einen Graphen; der die Viskosität von Xanthan enthaltendem Material zeigt, welches aus Glucose, Lactose oder geklärter Molke hergestellt wurde. Es wurden Lösungen von Xanthangummi mit bekannten Konzentrationen und unter Ausschluss von Wasser, Asche und Protein hergestellt. Die Viskositäten bei unterschiedlichen Schergeschwindigkeiten wurden gemessen und die Werte von einer Schergeschwindigkeit von 1,32 s^{-1} aufgetragen.

[0017] Symbole, Stämme und Wachstums- oder Verarbeitungsbedingen: • X59-1232 (Lac^-), Glucose; ■ X59-1232 (Lac^+), Lactose; ▲ X59-1232 (Lac^+), geklärte Molke; ⊟ X59-1232 (Lac^+), Lactose ohne Zusatz von geklärter Molke bei der Ernte; ⊞ X59-1232 (Lac^+), Lactose mit Zusatz von geklärter Molke bei der Ernte.

Beschreibung von speziellen Ausführungsformen

[0018] Untersuchungen in den Labors der Erfinder haben gezeigt, dass eine Anzahl von Modifikationen zu Verfügung steht, mit denen die Produktion von Xanthangummi aus Stämmen von Xanthomonas campestris verbessert werden kann. Drei spezielle genetische Modifikationen, die die Xanthanproduktion verbessern können, sind Mutationen, die zu Rifampicinresistenz führen, Mutationen, die zu Bacitracinresistenz führen und die Anwesenheit von exogenen genetischen Informationen, die die Synthese von Xanthan steuern und in einem Stamm von Xanthomonas campestris eingebaut sind.

[0019] Die ersten zwei dieser Methoden, die beide den Einsatz eines Mutantenstammes mit Resistenz gegen ein Antibiotikum einsetzen, können heute in einfacher Weise durchgeführt werden, weil die Beziehung zwischen Antibiotikaresistenz und Xanthanproduktion erkannt worden ist; dies ist offenbar und wird beansprucht

in EP-A-287 363, zu der die vorliegende Anmeldung eine Teilanmeldung darstellt. Die vorliegende Anmeldung betrifft die dritte Methode.

[0020] Diese dritte Methode zur Verbesserung der Xanthanproduktion umfasst den Einsatz von bisher nicht beschriebenen exogenen genetischen Informationen, die die Synthese von Xanthan steuern. Es wurden spezielle Bereiche der chromosomalen DNA von Xanthomonas identifiziert, die die Synthese von Xanthan steuern. **Fig.** 1 ist eine Chromosomenkarte, die die Information über die Restriktionsstelle zeigt, die zur Identifizierung der geeigneten Sequenzen geeignet ist.

[0021] Gemäß dem Budapester Vertrag zur internationalen Anerkennung über die Hinterlegung von Mikroorganismen für die Zwecke des Patentanmeldeverfahrens wurden bei der American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA, drei genetische Informationen hinterlegt (10. April 1987). Die drei Hinterlegungen sind E. coli-Stämme, die (unabhängig voneinander) die drei in **Fig.** 1 angegebenen genetischen Segmente enthalten. Den Hinterlegungen wurden die Hinterlegungsnummern ATCC 67 386, ATCC 67 387 und ATCC 67 388 zugewiesen.

[0022] Die genetische Information von X. camgestris kann auf viele Arten angewandt werden. Es können Plasmide konstruiert werden, die exogene genetische Information enthalten, die die Synthese von Xanthan steuert, und die Einführung der genetischen Information in einen X, campestris-Wirt kann mit einem Donorstamm erfolgen, der ein Plasmid mit der gewünschten genetischen Information in einem triparentalen Kreuzungsschema enthält, um die genetische Information auf X. camestris zu übertragen. Geeignete Vektoren für die Konjugation sind auch eine Vielzahl von Plasmiden, die einen breiten Wirtsbereich zeigen. Beispielsweise können Plasmide der IncP-Gruppe, die RK2 enthalten, und ihre Derivate pRK290, pLAFR1 und pRK311 und Plasmide der IncQ-Gruppe, die RSF1010 und dessen Derivat pMMb24 eingesetzt werden. Literaturstellen, die diese Plasmide beschreiben, sind z.B. Ditta et al, Plasmid (1985) 13: 149–153 (Plasmide RK2, pRK290 und pRK311); Friedman et al, Gene (1982) 18: 289–296 (pLAFRI) und Bagdasarina et al, Gene (1983) 26: 273–282 (pMMb24). Beispielsweise können E. coli-Donorzellen, die die genetische Information auf einem Plasmid enthalten, E. coli-HB101-Helferzellen, die das Plasmid pRK2013 enthalten, und rezipiente X. campestris-Zellen kopiert werden, um die Übertragung der genetischen Information durch Konjugation auszulösen. Der Isolierung von rekombinanten Plasmiden, beispielsweise durch Einsatz eines Markers, der in der Nähe der zu übertragenden genetischen Information vorhanden ist, kann eine weitere Reinigung und nachfolgende Paarung folgen. Mit einem gereinigten Mitglied der ursprünglichen Genbibliothek, um die Häufigkeit bzw. das Vorkommen von Exkonjugaten zu erhöhen, die die exogene genetische Information enthalten.

[0023] Einzelne Gene, die spezielle Peptide oder Kontrollfaktoren kodieren, die bei der Synthese von Xanthan eingesetzt werden, können aus der beschriebenen genetischen Information isoliert werden, wobei Standardverfahren der Technologie rekombinanter DNA eingesetzt werden. Rekstriktionsendonucleasen können eingesetzt werden, um das relativ große Segment der genetischen Information, die die Xanthan-Gene enthalten, in spezielle identifizierbare Fragmente zu zerschneiden. Diese Fragmente können individuelle geklont und identifiziert werden. Individuelle Fragmente können in einen neuen Wirt eingesetzt werden, um weitere X. campestris-Stämme mit größerer Xanthanproduktion herzustellen. Dementsprechend sind Fragmente der genetischen Information, die die Synthese von Xanthan steuern, auch nützlich bei der industriellen Produktion von Xanthan. Die Formulierung „genetische Information, die die Synthese von Xanthan steuert" bezieht sich dementsprechend entweder auf die ursprüngliche chromosomale DNA, die die Xanthansynthese wie beschrieben steuert, oder auf Fragmente dieser ursprünglichen chromosomalen DNA, die eine oder mehrere einzelne Gene enthält, mit denen die Synthese von Xanthan gesteuert werden kann, (z.B. einzelne Gene, die ein Enzym kodieren, das bei der Xanthansynthese eingesetzt wird).

[0024] Spezielle Beispiele, die die Manipulation des genetischen Materials zeigen, werden in den nachfolgenden Arbeitsbeispielen angegeben. Es wurden Klone hergestellt, die Fragmente der die Synthese von Xanthan steuernden genetischen Information enthalten. Die Selektion dieser Klone gestattete die Isolierung von Stämmen mit besseren Eigenschaften, wie z.B. größere Viskosität. Das genetische Material wurde in Kombination mit bekanntem genetischen Material übertragen, um modifizierte Stämme herzustellen, die auf bisher nicht verfügbare Weise eingesetzt werden können. Beispielsweise wurde das erfindungsgemäße genetische Material zusammen mit genetischer Information zur Steuerung der Herstellung von Lactase übertragen, womit ein Stamm erhalten wurde, der für die Herstellung von Xanthangummi mit Käsemolke als Substrat besonders geeignet ist.

[0025] Beispielsweise wurde ein stabiler rekombinanter Stamm X59-1232 erhalten, der aus Lactose Xanthangummi von guter Qualität herstellt, indem die lac-Gene von TransposonTn951 in das Chromosom vom X. campestris-Stamm X59 eingeführt wurden. Die erkennbare Wirksamkeit der Umwandlung von Lactose in Xanthangummi mit diesem Stamm entsprach der Umwandlung von Glucose in Xanthangummi durch den Stamm X59, ein Stamm, der hier weiter erörtert wird und die letztere Umwandlung wirksam durchführt. Die Viskosiät der Xanthangummen aus diesen zwei Quellen war äquivalent. Nach mehr als 14 Wachstumsgenerationen ohne positive Selektion auf genetisch verursachte Eigenschaften war die erkennbare Wirksamkeit der Umwandlung von Lactose durch den Stamm X59-1232 besser als die von Stamm X59-pGC9114, ein Stamm, der die lac-Ge-

ne Tn951 auf einem mehrfach kopierten Plasmid (pGC9114) trägt, wobei dieser Stamm wiederum besser war, als der Stamm X59, dem die lac-Gene Tn951 fehlen. Die Überlegenheit von X59-1232 könnten auf einem stabilen Einbau der lac-Gene in das Chromosom X59-1232 zurückzuführen sein.

[0026] Die Wirksamkeit der Umwandlung in Xanthangummi durch X59-1232 für geklärte Käsemolke betrug etwa 90% der von Lactose in Xanthangummi. Dieser Unterschied von 10% zum theoretischen Wert liegt möglicherweise innerhalb des experimentellen Fehlers der eingesetzten Messungen.

[0027] Nach dem Kultivieren eines Xanthomonas-Stamms, der eine Xanthan verbessernde Modifikation aufweist, wird Xanthan aus dem Kulturmedium abgetrennt, wobei Verfahren eingesetzt werden, mit denen dies erzielt werden kann, wie z.B. Standardverfahren, die bereits industriell eingesetzt werden; siehe beispielsweise Kennedy et al, supra. und Rogovin et al, supra. Ein einfaches Verfahren umfasst das Filtrieren eines flüssigen Kulturmediums zur Entfernung von wachsenden Bakterienzellen, den Zusatz von Isopropylalkohol zum Filtrat zum Ausfällen der Exopolysaccharide und das Sammeln des Niederschlags auf einem Filter gefolgt von Trocknen (wahlweise mit Wärme und/oder unter Vakuum).

[0028] Nach der allgemeinen Beschreibung der Erfindung ergibt sich ein besseres Verständnis durch die nachfolgenden detaillierten Beispiele, die lediglich der Erläuterung dienen und nicht als Beschränkung der Erfindung zu verstehen sind, soweit dies nicht festgestellt wird.

Experimenteller Teil

Beispiel 1

Verwendung von exogener genetischer Information, die die Synthese von Xanthan steuert

[0029] Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Mutationen, die die Synthese von Xanthangummi durch Xanthomonas campestris B1459S-4LII nach der Behandlung mit Ethylmethan-Sulfonat als nichtmukoide Kolonien isoliert und dazu verwendet wurden, DNA-Fragmente zu identifizieren, die Xanthangene enthalten. Vollständige Bibliotheken von DNA-Fragmenten aus wildem X. campestris wurden in E. coli kloniert, wobei ein Cosmidvektor mit breitem Wirtsbereich eingesetzt wurde, und dann durch conjugates Kreuzen in jeden Mutantenstamm übertragen. Klonierte Fragmente, die die Synthese von Xanthangummi wiederherstellten (Xgs^+; Mucoität) wurden charakterisiert nach Maßgabe des Restriktionsmusters, der Homologie der DNA-Sequenz und der Komplementation eines Untersatzes von Xgs^-. Es wurde gefunden, dass Klongruppen, die überlappende homologe DNA enthielten, spezielle Xgs^--Mutationen komplementierten. Die Ergebnisse deuten auf ein Clustern der genetischen Loci hin, die bei der Synthese von Xanthan beteiligt sind. Es wurden auch andere Loci gefunden, die offensichtlich unverknüpft waren. Zwei Formen der Komplementation wurden beobachtet. In den meisten Fällen wurde gefunden, dass unabhängig isolierte Cosmidklone, die eine einfache Mutation komplementieren, teilweise homolog sind. Weniger häufig war die zweite Form der Komplementation, bei der zwei Cosmidklone, die keine homologen Sequenzen aufwiesen, den Phänotyp des Mucoids zu einem einzelnen Mutanten wiederherstellten. In dem einen Fall, der im Detail studiert wurde, zeigte sich, dass die Wiederherstellung des Phänotyps des wilden Mucoids mit homologer Rekombination zwischen einer normal klonierten DNA zusammenfiel, die auf einem Plasmid und dem chromosomalen Locus des Mutanten sitzt. Schließlich wurde für die komplementierten Mutanten und für das wilde X. campestris, welches Mehrfachkopien der Cosmidklone trägt, das Ausmaß der Wiederherstellung der Xanthansynthese gemessen. Einzelheiten der experimentellen Methoden und der Ergebnisse werden nachstehend mitgeteilt.

Materialien und Methoden

Bakterienstämme und Plasmide

[0030] Xanthomonas campestris B1459S-4L-II (unser Stamm X55, erhalten vom Northern Regional Research Center) war der Xgs+ (xanthangummisynthesepositiv)Stammvater aller unserer X. campestris-Stämme. Der Stamm X59 war ein spontanes rifampicinresistentes Derivat von X55, der ebenfalls Xgs^+ war. Rif^r-Derivate von X55 entstanden mit einer Häufigkeit von etwa 10^{-9} und wurden auf Agarplatten gesammelt, die mit Rifampicin (60 µg/ml) ergänzte Lurianährlösung enthielten. Die Bakteriophage λb221 rex:: Tn5 cl857 Oam29 Pam80 (Ruvkun et al, Nature (1981) 289: 85-88) war die Quelle für Tn5 für die Kartierung der Inaktivierung der einzuschiebenden Gene. Der Stamm LE392 war der geeignete Wirt für die Propakation der Phage. Alle Stämme und Plasmide sind in Tabelle 1 aufgelistet:

Tabelle 1

Bakterienstämme und Plasmide		
Name	Genotyp oder Phänotyp[a]	Herkunft oder Quelle
X. campestris		
X55	Xgs^+, prototrop	B1459S-4L-II
X59	Xgs^+, prototrop, Rif^r	dieses Beispiel
X59m1	Xgs^-, prototrop, Rif^r	dieses Beispiel
X59m8	Xgs^-, auxotrop, Rif^r	dieses Beispiel
X59m9	Xgs^-, prototrop, Rif^r	dieses Beispiel
X59m11	Xgs^-, auxotrop, Rif^r	dieses Beispiel
X59m31	Xgs^-, prototrop, Rif^r	dieses Beispiel
X59m45	Xgs^-, prototrop, Rif^r	dieses Beispiel
X59m48	Xgs^-, auxotrop, Rif^r	dieses Beispiel
X59m65	Xgs^-, prototrop, Rif^r	dieses Beispiel
X59m82	Xgs^-, prototrop, Rif^r	dieses Beispiel
X59m96	Xgs^-, auxotrop, Rif^r	dieses Beispiel
X59m145	Xgs^-, prototrop, Rif^r	dieses Beispiel
E. coli		
HB101	F^- hsd20 ($r_B^-m_B^-$), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, (Streptomycinresistenz), xy1-5, mt1-1, supE44, thi, leu, λ-recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, Δ(lac-proAB),	Bethesda Research Labs
JM109	[F'traD36, proAB, $lacI^qZ$ ΔM15	Bethesda Research Labs
LE392	F^-, hsdR514, ($r_K^-m_K^-$), supE44, supf58, λ-galK2, galT22, metB1, trpR55, lacY1, Δ lac IZY-6	L. Enquist
Bakteriophage	λb221 rex::Tn5 (Kan^r) cl857, Oam29, Pam80	Ruvkun et al, Nature (1981) 289 :85-88
Plasmide		
pRK311	Herkunft: RK2, Tra^+; Mob^-, Tet^r, λcos, lacZ(∞)	Ditta et al ,Plasmid (1985) 13:149-153

pRK2013	Herkunft: ColE1, Imm^+, Amp^r, Tra^+, Mob^+, Kan^r	Figurski et al. Proc Nati Acad Sci USA (1979) 76 :1648-1652
	Amp^r, Herkunft: ColE1	Veira et al , Gene (1982) 19:259-268
pUC13	pRK311, Tet^r, Komplemente m1	dieses Beispiel
c1	pRK311, Tet^r, Komplemente m8	dieses Beispiel
c8	Tet^r, Kan^r	dieses Beispiel
c8::Tn5-1- +20	pRK311, Tet^r, Komplemente m9	dieses Beispiel
c9	pRK311, Tet^r, Komplemente m31	dieses Beispiel
c31	pRK311, Tet^r, Komplemente m45	dieses Beispiel
c45	pRK311, Tet^r, Komplemente m65	dieses Beispiel
c65	pRK311, Tet^r, Komplemente 82	dieses Beispiel
c82	pRK311, Tet^r, Komplemente m1	dieses Beispiel
c1H5	pRK311, Tet^r, Komplemente m9	dieses Beispiel
c9H7	pRK311, Tet^r, Komplemente m9	dieses Beispiel
c9e		dieses Beispiel

[a] Abkürzungen: Xgs^+ Xanthangummisynthese; Rif^r Rifampicinresistenz; Tet^r Tetracyclinresistenz; Kan^r Kanamycinresistenz; Amp^r Ampicilinresistenz; Imm^r Colicin E1-Immunität; Tra und Mob, Übertragungs- und Mobilisierungsfunktionen des RK2-Plasmids

Wachstumsmedien

[0031] Xanthomonas-Spezien wurden kultiviert durch Schütteln in flüssigem YT-Medium bei 30°C mit Zusatz von 50 µg/ml Rifampicin, 7,5 µg/ml Tetracyclin und/oder 50 µm/ml Kanamycin, die zur Stabilisierung des Plasmids zugesetzt wurden. Das YT-Medium enthält Bactotrypton (16 g/l), Bactohefeextrakt (10 g/l) und NaCl (5 g/l). Alle Nähragarplatten enthielten TBAB (Agarbase aus Trytoseblut von Difco) plus 1% (g/v) Stärke. Die Selektionsplatten für das konjugale Kreuzen enthielten 7,5 µg/l Tetracyclin, 50 µg/l Kanamycin und 50 µm/l Difampicin. Minimalagarplatten enthielten die anorganischen Salze M9 (Anderson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1946) 32: 120–128) plus Glucose, Manose oder Fructose in einer Menge von 1% (g/v) als Kohlenstoffquelle. Das flüssige Medium für Versuche in Schüttelkolben zur Messung der Xanthanakkumulation wird als „XG004" bezeichnet und bestand aus 1 X basischen Salzen, 0,5% (g/v) Trypton, 0,25% (g/v) Hefeextrakt, 1 X Spurmineralien, 0,01% (g/v) $CaCl_2$ und 2% (g/v) Glucose. 10 X basische Salze bestehen aus 6,8 g KH_2Po_4, 0,2 g $MgSO_4$. $7H_2O$, 2,2 g L-Glutaminsäure, 2 g Citronensäure in 100 ml, wobei der pH-Wert mit NaOH bei 30 °C auf 7 eingestellt war. 100 X Spurenmineralien waren 2,25 g $FeCl_3$. $6H_2O$, 1,41 g $MnSo_4 \cdot H_2O$, 2,2 g $ZnSO_4$. $7H_2O$, 0,25 g $Cu\text{-}SO_4$. $5H_2O$, 0,4 g $CoCl_2$. $6H_2O$, 0,26 g Na_2MoO_4. $2H_2O$, 0,4 H_3BO_3 und 0,06 g KI pro Liter entioniziertem H_2O (wobei zur Lösung der Salze HCl zur Lösung der Salze zugesetzt wurde). E.coli wurde soweit dienlich in Luria-Medium bei 37 °C mit Zusatz von 10 µg/ml Tetracyclin und 50 µg/ml Kanamycin gezüchtet oder auf Agarplatten, die Luria-Medium oder TBAB (Difco) enthielten.

[0032] Mutagenese von X. campestris Etwa zwei x 10^9 frischgezüchtete Zellen (eine Extinktion von 1 bei 600 nm entspricht 10^9 X. campestris-Zellen wurden in 2 ml eines Mineralsalzmediums suspendiert und unter Zusatz von 40 µl Ethylmethansulfonat (EMS) 1, 2 oder 3 h lang bei 30 °C geschüttelt. Nach jeder Behandlung wurden Proben von 0,5 ml entnommen, zweimal mit Yt-Medium gewaschen und in 2 ml YT-Medium resuspendiert und über Nacht bei 30 °C geschüttelt. Verdünnungen wurden auf TBAB plus 1% (g/v) Stärkeplatten ausgebreitet. Nach drei Tagen wurden nicht-mukoide Kolonien (etwa 1% der Gesamtmenge) geerntet. Die als X59m1 bis X59m150 bezeichneten Mutanten wurden auf die Retention des Rif^r-Markes des Ausgangsstamms X59, auf die Anwesenheit von klaren Zonen um Kolonien auf stärkeenthaltenden Platten und auf ihre Fähigkeit der Utilisirung von Kohlestoffquellen untersucht.

DNA-Isolation und rekombinante DNA-Methoden

[0033] Plasmid-DNA wurde mit dem Siedeverfahren von Birnboim du Doly (Nucleic Acids Res. (1979) 7:

1513–1523) isoliert. Häufig eingesetzte Plasmide wurden darüber hinaus durch Gleichgewichtssedimentation in Dichtegradienten von CsCl gereinigt, die Ethidiumbromid enthielten (Maniatis et al, 1982, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboraton, Cold Spring Harbor, NY). Die Restriktionsenzyme (von Boehringer Mannheim GmbH) wurden nach den Vorschriften des Herstellers eingesetzt. Die Homologie der DNA-Sequenz wurde gezeigt durch das Blotting-Verfahren von Southern (Maniatis et al, supra), wobei für die DNA-Immobilisierung eine Zeta-Sonde (Bio-Rad) eingesetzt wurde. Die für die Hybridisierungssonde eingesetzte DNA war mit [^{32}P]dCTP markiert (für die Nick-Translation wurde ein Reagenziensatz von Bethesda Research Laboratories eingesetzt). DNA-Fragmente wurden in Tris-Acetatpuffer (Maniatis et al, supra) elektrophonetisch durch Agarosegele (0,6 bis Konjugation und Komplementierung von Xgs$^-$-Mutanten Die vollständige Bibliothek (oder spezielle Elemente der Bibliothek) wurden mit triparentalen Kreuzungsschema (Ditta et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77: 7347–7351) von E. coli auf X. campestris übertragen. Aus frischen Über-Nacht-Kulturen wurden 10^9 Empfängerzellen (Xgs$^-$-Mutanten von X. campestris) 5×10^8 Donorzellen (JM109-L[X59], die Bibliothek) und 5×10^8 Helferzellen (E. coli HB101 enthaltend das Plasmid pRK2013) gemischt und durch einen HA-Milliporfilter 0, 45 µm geschickt. Die Filter wurden über Nacht bei 30 °C auf TBAB-Platten inkubiert und dann die Zellen in 2 ml Selektionsmedium (TBAB mit 7,5 µg/ml Tetracyclin und 50 µg/ml Rifampicin) gewaschen. Die Zellen wurden im Verhältnis 10^4 bis 10^5 verdünnt und auf Selektionsplatten ausgebreitet, die Antibiotika enthielten. Die Komplementation (Wiederherstellung des Xgs$^+$-Phänotyps in einem Xgs$^-$-Mutanten) erfolgte mit einer Häufigkeit von 0,1 bis 0,5 . Die Xgs$^+$-Exkonjugate wurden gereinigt und das rekombinante Plasmid isoliert und zur Aufbewahrung und weiteren Reinigung auf E. coli JM109 zurück übertragen. Die weitere Kreuzung mit einem gereinigten Mitglied der Bibliothek erhöhte die Xgs$^+$-Häufigkeit in dem Exkonjugaten auf 100%.

Messung der Xanthan-Akkumulation

[0034] Die zu untersuchenden Stämme wurden über Nacht in flüssigem XG004-Medium gezüchtet, verdünnt und mit der gleichen Zelldichte suspendiert. Kolben (Fassungsvermögen 125 ml), die 100 ml des Mediums XG004 enthielten, wurden mit gleicher Anzahl von Zellen (1×10^8) geimpft und bei 28 °C und 250 min^{-1} geschüttelt. Während des Stehens der Proben wurden jedem Kolben 20 ml Isopropylalkohol zugesetzt, um die Exopolysaccharide auszufällen. Der Niederschlag wurde auf einem GFA-Filter gesammelt, welches dann in einem Vakuumofen getrocknet und gewogen wurde.

Ergebnisse

Isolation von defekten Mutanten bei der Synthese von Xanthanpummi (Xgs$^-$)

[0035] sDer Stamm X55 (NRRL B1459S-4L-II des Northern Regional Research Center) ist der Stammvater des "wilden Typs" der meisten heute eingesetzten xanthanproduzierenden Stämme von X. campestris. Der Stamm X55 war der. Stammvater aller anderen X. campestris, die bei dieser Arbeit eingesetzt wurden. Es wurde ein spontanes Rif^r-Derivat von X55 isoliert durch Ausbreiten von etwa 10^9 Bakterien auf einer Platte, die 60 µg/ml Rifampicin enthielt. Der Rif^r-Phänotyp von X59 war geeignet als Markierer zur Unterscheidung der Zellvermehrung von Verunreinigungen nach der Mutagenese und bei der Gegenselektion nach E. coli-Donoren bei konjugalen Kreuzungen. Sowohl X55 als auch X59 bilden nicht zu unterscheidende mukoide Kolonien auf Nähr- und Minimalagarplatten.

[0036] Es wurde eine Auswahl von Xgs$^-$-Mutanten erzeugt, indem der Stamm X59 (und weniger häufig X55) Ethylmethansulfonat (EMS) ausgesetzt wurde. Nach Wachstum bei 30 °C über drei nicht-mukoide Kolonien gesammelt und für die weitere Verwendung gereinigt. In den meisten Fällen unterschieden sich die nicht-mukoiden Kolonien erheblich in ihrem Aussehen, jedoch zeigten einige unabhängig isolierte Mutanten ein ähnliches nicht-mukoides Aussehen. Letztere konnten unterschieden werden durch Ausplattieren auf unterschiedlichen Kohlenhydratquellen und als Funktion der Wachstumszeit. Bei jeder Behandlung mit EMS wurde nur ein Mutant ausgewählt, außer wenn die Morphologie der Kolonie unverkennbar war. Die Mutanten von X59 (die fortlaufend nummeriert mit X59m1 bis X59m200 bezeichnet sind) wurden auf den parentalen Rif^r-Markierer untersucht. Hinweise darauf, dass ein Überlebender der Mutagense X. campestris war (ein Amylaseproduzent) war die klare Zone um die Kolonien, die auf einer stärkeenthaltenden Nähragarplatte ausgebreitet waren und das charakteristische gelbliche Pigment der Kolonie. Viele der Mutanten wurden auch auf ihre Fähigkeit zum Wachstum auf Minimalagarplatten untersucht, die eine Reihe von Zuckersubstraten enthielten, um unikale Isolate von Geschwistern zu unterscheiden.

Klonieren der X. campestris-DNA in einen Cosmidvektor

[0037] Die gesamte DNA des Stammes X59 (Xgs$^+$) wurde mit der Siedemethode von Birnboim and Doly, sup-

ra hergestellt und mit Sau3A-Restriktionsendonuklease teilweise digestiert. Große Fragmente von 20 bis 30 kb wurden mit Geschwindigkeitssedimentation bei neutralen Saccharosegradienten gereinigt. Dies stellte sicher, dass bei der Legierung nur benachbarte chromosomale DNA-Fragmente in den Klonierungsvektor eingeschoben wurden. Der Klonierungsvektor war das von Ditta et al, supra, konstruierte Cosmid mit breitem Wirtsbereicht, pRK311. Zu klonierende DNA-Fragmente wurden in die BamHI-Sequenz der mehreren Klonierungsstellen innerhalb des lacZ-Bereiches des Vektors. Es wurde eine In-Vitro-Packung von Strat-Gene verwendet. Für die In-Vitro-Packung für die Insertierung von DNA in die Cosmidvektoren wurden etwa 20 bis 25 kb ausgewählt. Der pRK311-Vektor trägt auch ein selektierbares Tetracyclinresistenzgen. Nach der Ligation und Verpackung in vitro wurde E. coli JM101 mit Phagenteilchen transfiziert und tetracyclinresistente Kolonien individuell gewonnen. Jede tetracyclinresistente Kolonie enthielt den Plasmidvektor zuzüglich einer Insertion der X. campestris-DNA von 20 bis 25 kb. Durch das Poolen der Klone ergab sich eine Bibliothek der DNA-Fragmente. Weil die Anzahl der Klone in jeder Bibliothek 1.000 überstieg, waren wir mindestens 99,9% sicher, dass alle Fragmente des X. campestris-Chromosoms mindestens einmal abgebildet wurden. In diesem Beispiel wurden drei unterschiedliche Bibliotheken verwendet.

Komplementierung von Xgs Defekten durch klonierte normale DNA

[0038] Zum Transferieren von DNA wurden intergenetische konjugale Kreuzungen verwendet. Das von RK2 stammende Plasmid pRK311 hat einen breiten Wirtsbereich, ist jedoch nicht selbst transferierbar. Damit pRK311 durch Konjugation zwischen E. coli und X. campestris transferiert werden kann, wurde ein zweites „Helfer"plasmid eingesetzt, pRK2013, welches einen begrenzten Wirtsbereich hat, der X. campstris nicht umfasst. Der Transfer von rekombinanten Cosmiden wurde durch triparentales Kreuzen erreicht, welches E. coli JM109/pRK3311, JM109/pRK2013 und den rezipienten Mutanten (Xgs^-) von X. campestris umfasste.

[0039] Durch konjugales Kreuzen mit der vollständigen Bibliothek der X. campestris-Gene wurden etwa 15 unterschiedliche Xgs^--Mutanten komplementiert und zur Mukoität (Xgs^+) wiederhergestellt. Die Häufigkeit der Komplementierung betrug bei den meisten Kreuzungen etwa 0,1%, wie es zu erwarten wäre, wenn es nur eine Kopie eines jeden Gens pro Chromosom gäbe. Die Ergebnisse können verstanden werden durch Betrachten eines Satzes von verwandten Kolonien: X59-pRK311, X59m45-pRK311 und X59m45-c45. Die Anwesenheit des c45-Cosmids stellt das mukoide Aussehen wieder her, wie es beim Wildtyp X59 beobachtet wird. Der mukoide Phänotyp für X59m45-c45 hing ab von der ständigen Anwesenheit des rekombinanten Plasmids, wie es sich aus der Beibehaltung des Tet^r-Gens des Plasmids ergibt. Ein ähnliches Gesamtmuster wurde für alle komplementierten Xgs^--Mutanten beobachtet. Einige mukoide Exkonjugate wurden entnommen und durch Replattieren gereinigt. Für jedes wurde die DNA hergestellt und in E. coli transformiert und dann zurück gekreuzt in den Mutantenstamm des ursprünglichen Mutanten Xgs^-. Dies ergab in jedem Fall eine Komplementierung von 100%, wobei alle Tetracyclineresistenten Econjugate das gleiche rekombinante Cosmid trugen. Die Transformanten von E. coli dienten auch als Quelle der DNA für die Restriktionskartierung sowie die Hypbridisierungsuntersuchungen der DNA durch das Soutern Blotting. Eine Zusammenfassung der Komplementierungsdaten ist in Tabelle 2 angeben.

Tabelle 2

Komplementierung von Xgs⁻-Mutationen durch klonierte DNA von X. campestrist des Wildtyps[a]								
Mutant	Kloniertes Fragment							
	c1	c8	c9	c11	c31	c45	c65	c82
m	+	+/-	-	-	+/-	-	+/-	-
m8	-	+	-	-	+	-	+	-
m9	-	+/-	+	+	-	-	-	+
m11	-	+/-	+	+	-	-	-	+
m31	-	+	-	-	+	-	+	-
m45	-	+	-	-	-	+	-	-
m48	-	+	-	-	-	+	-	-
m65	-	+	-	-	+	-	+	-
m82	-	+/-	+	+	+/-	-	+/-	+
m96	-	+	-	-	+	-	+	-
m145	-	-	-	NT	-	-	-	+

a Xgs⁻ -Mutanten, die ein rekombinates Cosmid erhielten, wurden durch visuelle Untersuchung der Kolonien im Sinne eines Mucoiden (+) oder nicht mucoiden (-) Aussehens beurteilt. Die Bezeichnung +/- bezeichnet eine teilweise Mucoität. NT: nicht untersucht.

Ausrichtung von klonierten Inserts und Xgs⁻-Mutationen durch Restriktionskartierung, DNA-Hybridisierung und genetische Komplementierung

[0040] Wenn mehr als ein rekombinantes Plasmid der vollständigen Bibliothek die gleiche Mutation komplimentierte, wurde normalerweise gefunden, dass sie entweder nicht unterscheidbare Geschwisterklone waren oder eine beträchtliche DNA-Homology teilten. Die Analyse der DNA-Hybridisierung demonstrierte diesen Punkt. Einige rekombinante Plasmide wurden mit einem Gemisch aus EcoRI- und HindIIIEnzymen. HindII schneidet in die Stelle der Mehrfachklonierung zu einer Seite des klonierten Inserts, EcoRI schneidet die andere Seite, und zwar innerhalb des Vektors. Dies erzeugt zwei Fragmente der Vektor-DNA von etwa 8 und 13 kbp. Die Abbauprodukt wurden elektrophonetisch durch Agarosegele getrennt und zwei Proben analysiert (A und B), die die gleichen Abbauprodukte enthielten. Die meisten der sichtbaren Banden der Färbung mit Ethidiumbromid waren die X59-DNA. Die Hybridisierungssonden für die Probe A waren ein radiomarkiertes c45-Plasmid, für die Probe B das Plasmid c31. Das Hybridisierungsmuster zeigte, dass die Cosmide c8, c31, c45 und c65 überlappende Segmente chromosomaler DNA tragen. Der Bereich, den diese vier Klone gemeinsam haben, umfasst Restriktionsfragmente von 0,6 und 1,2 kb und einen Teil des Fragments mit 4,3 kb.

[0041] Weitere Hybridisierungsergebnisse ergaben sich aus einer anderen, jedoch ähnlichen Analyse. Die Plasmid-DNA wurde gereinigt mit einem Gemisch aus EcoRI- und HindIII-Enzymen eingeschränkt und die Fragmente durch Elektrophorese auf Agarosegelen getrennt und dann auf Filter übertragen. Bei einer ersten Probe war die Sonde radiomarkiertes c9H7, bei einer zweiten Probe c1H5. Das Hybridisierungsmuster der ers-

ten Probe zeigte Homologie zwischen c9H7, c9 und c145, jedoch nicht zwischen c9H7 und c45-2, c45-1, c8, c31, c23b, c1 oder c1H5. Das Muster der zweiten Probe zeigt, dass c1H5 nur zu c1 homolog ist. Das Cosmid c1H5 wurde ursprünglich aus der Bibliothek der klonierten Fragmente ausgewählt, weil es zu c1 hybridisiert ist. Die Hybridisierungsergebnisse waren die Basis zum Erstellen der in **Fig.** 1 gezeigten Karte.

[0042] Die abgeleiteten Orte von Xgs^--Mutationen sind in **Fig.** 1 oberhalb der Karte der EcoRI- und HindIII-Restriktionsstellen an der linken Seite mit "R/H" bezeichnet. Von Klammern eingeschlossene Mutanten wurden zueinander nicht geordnet. Überlappende klonierte Fragmente konnten nach Maßgabe des Restriktionsmusters und der den DNA-Homologie ausgerichtet werden. Dieser Ausrichtung überlagert sind Ergebnisse der Komplentierungsversuche, wobei "+" die Wiederherstellung des Xgs^+-Phänotyps für einen Xgs^--Mutanten bedeutet. Dann wurde für jeden Mutanten aus den Grenzen jedes klonierten Fragments der Bereich der möglichen Kartenpositionen bestimmt. Die meisten der Mutanten waren über einen angrenzenden Bereich von etwa 40 kgp verteilt was etwa 2% des Chromosoms von X. campestris entspricht. Ebenso wurden zwei andere unvernetzte Loci identifiziert, die an der Xanthansynthese beteiligt sind. Ein Locus wird durch vier überlappende klonierte Fragmente dargestellt die auf den Cosmide c9, c11, c9H7 und c82 getragen werden. Alle vier stellen den mukoiden Phänotyp Xgs^+ zu den unabhängigen Mutanten m9, m11 und m82 her. Ein weiteres Cosmidenpaar (c1 und c1H5) teilen miteinander die Homologie, jedoch nicht mit einem der anderen zwei Sätze.

[0043] Xanthansynthese durch Exconjuganten von X59 mit Mehrfachkopien von komplementierenden klonierten Genen.

[0044] Jeder Komplementierungsklon wurde durch Kreuzen in X59, bereits Xgs^+, transferiert und die Xanthansynthese gemessen. Als Kontrolle wurde X59 verwendet, der den Vektor pRK311 alleine trug. Die Zellen wurden in Schüttelkolben bei 30 °C gezüchtet, wobei mit Impfmengen von 10^7 Zellen pro ml begonnen wurde. Dann wurde mit Standartmethoden die Xanthanmenge bestimmt, und es folgte die Fällung der Exopolysaccharide durch 2 Volumina Isoprpanol sowie Trocknen und Wägen. Bei den meisten Komglementierungsklonen hatten die zusätzlichen Genkopien keinen feststellbaren Einfluss oder führten zu einer Abnahme der Xanthanausbeute. Soweit sie signifikant mehr Xanthan lieferten als die Kontrolleprobe, sind die Daten für die Xanthan und den Zellwachstum in **Fig.** 2 angegeben. In keinem Fall betrug die Zunahme mehr als 20%. Jedoch war die Geschwindigkeit der Xanthanbildung zwischen 24 und 36 h bei X59-c45 doppelt so groß als bei der Kontrollprobe X59-pRK311. Wenn bei Langzeitversuchen X59 ohne pRK311 eingeschlossen wurde, wurde gefunden, dass der große Plasmidvektor selbst eine negative Wirkung auf die Xanthansynthese hat (Daten nicht gezeigt). Bei ähnlichen Versuchen produzierte X59-c8 im Mittel 22% mehr Xanthan als der Ursprungsstamm X59 (Wachstumsperiode) von 48 h).

[0045] Diese Beispiele zeigen, dass alle drei in **Fig.** 1 beschriebenen Komplementärbereiche, die Xanthangene enthalten, geeignet für die Herstellung von Stämmen sind, die eine bessere Xanthanproduktion zeigen. Bei Einbau der exogenen genetischen Information wurden reproduzierbare Änderungen der Xanthanbildung beobachtet, jedoch waren diese Änderungen klein, etwa +/- 15%. Die Unterdrückung der Xanthanproduktion wurde durch den großen Plasmidvektor selbst verursacht, der das Zellwachstum und die Xanthansynthese unterdrückte. Der Einsatz von anderen Plasmidvektoren sollte die Produktivität der Stämme verbessern.

Beispiel 2

Subklonieren des c8-Fragments und die dadurch entstehende Xantanproduktion

[0046] Das "c8"-Fragment der X. campestris-DNA wurde weiter subkloniert um die nützlichen genetischen Wesenszüge zu lokalisieren. Die subklonierten Bereiche bezüglich c8 sind in **Fig.** 3 dargestellt (sie entspricht **Fig.** 1).

[0047] Jeder Subklon wurde in den für den Großteil dieser Arbeiten verwendeten Vektor, pRK311 insertiert und zu erst in E. coli transfomiert und dann in E. coli zu den X. campestris-Stämmen X55, X59 und X50 konjugal gekreuzt. Das Zellwachstum und die Xanthanmenge wurden gemessen in Schüttelkolben von 100 bis 500 ml in Nährmedium, welches pro Liter Leitungswasser folgendes empfiehlt: 10 g Pepton, 20 g Glucose, 3,5 g K_2HPO_4, 2,6 g KH_2PO_4, 0,26 g $MgSO_4$ mit $7H_2O$, 6 mg H_3Bo_3, 6 mg ZnO, 2,6 mg $FeCl_3$ mit $6H_2O$, 20 mg $CaCO_3$ und 0,13 ml (11, 6 n). Die Viskositäten wurden bestimmt für rohe Kulturmedien und halbgereinigten Xanthangummi. Wie bei Beispiel 1 erfolgte eine teilweise Reinigung von Xanthan durch Fällung der Polysaccharide durch Zusatz von 2 Volumina Isopropylalkohol und Sammeln des Niederschlags auf einem GFA-Filter, gefolgt von Trocknen und Wägen. Die Ergebnisse sind nachfolgend aufgelistet.

[0048]

Tabelle 3

Wirt	Plasmid	Ausbeute (g Xanthan/l)	Viskosität (cps bei 1 min^{-1})[a]	
			Fermetationsmedium	0,5 % (g/v) halbgereinigtes Xanthan
X59	pRK311	14	620	340
	c8	17	1000	300
	c8C	15	1300	480
	c8D	14	420	110
	c1021	--	--	--
	c1020	12	140	270
	c1042	17	500	170
	c1041	17	710	320
X50	pRK311	16	1700	420
	c8	17	2100	460
	c8C	17	3200	800
	c8D	14	930	290
	c1021	13	880	320
	c1020	15	420	300
	c1042	18	960	270

[a]Viskosimeter Brookfield LV mit Spindel Nr. 18 oder 31. Die Fermetationsmedien wurden vor der Messung der Viskositäten 1:1 mit Nacl (0,1 m) verdünnt.

[0049] Der Subklon c8C bildet soviel Xanthan im Kulturmedium wie der Stammklon c8; jedoch hat das Produkt pro Gewichtseinheit des halbreinen Materials eine unerwartet höhere Viskosität. Das Klonieren und die Wiedereinführung von klonierter DNA in X. campestris beeinflusst deshalb sowohl die Quantität als auch die Qualität von Xanthan, wobei eine bessere Viskosität (oder andere Eigenschaften) erhalten werden kann, indem man Subklone auswählt, die die gewünschten Eigenschaften haben.

Beispiel 3

Direktutilisierung von Lactose in geklärter Käsemolke für die Synthese von Xanthangummi

[0050] Bei diesem Beispiel wird die Konstruktion oder ein Plasmidvektor beschrieben, der geeignet ist für den Einbau einer fremden DNA in das Chromosom von X. camestris mit diesem Vektor wurden die lac-Gene von pGC9114 (RP1::Tn951) in ein rifampicinresistentes Derivat von X. campestris B1459 insertiert. Die genetische Stabilität der Lactoseutilisierung und die Umwandlung von Lactose in geklärter Molke in Xanthangummi wurden bestimmt. Zusätzlich wird eine vorläufige Charakterisierung der Qualität des Xanthangummis gegeben, der durch diesen Stamm aus geklärter Käsemolke hergestellt wird.

Materialien und Methoden

Bakterienstämme, Plasmide und Wachstumsbedingungen

[0051] sEinige Materialien sind in Beispiel 1 beschrieben. X. campestris B1459S-4L-II (unser Stamm X55) wurde erhalten vom Northern Regional Research Center in Peoria, Illinois. Der E. coli-Stamm Mc1009 (Δ lac ipozy-X74, galK, galU, Δ ara-leu-7697, strA, recA) wurde von J. Hoch erhalten, Stamm JC3272 (hls, trp, lys, Δ lac ipozy-X47, strA), der das Plasmid pGC9114 (RP1::Tn951) enthielt, von G. Somkuti. Das Plasmid pRK290 wurde erhalten von D. Helsinki (Ditta et al, Proc. Natl. Acad, Sci. USA (1980) 77: 7347–7315). Die Xanthomonas-Stämme wurden kultiviert bei 30 °C in vier ähnlichen flüssigen Medien oder festen Medien (mit Agar): YT (10 g/l Difco-Hefeextrakt, 16 g/l Difco-Trypton, 5 g/l NaCl); YTS (5 g/l Difco-Hefeextrakt, 5 g/l Difco-Trypton, 3,5 g/l K_2HPO_4, 2,6 g/l KH_2PO_4, 0,26 g/l $MgSO_4$, 7 H_2O, 6 mg/l H_3BO_3, 6 mg/l ZnO, 2,6 mg/l $FeCl_3$. $6H_2O$, 20 mg/l $CaCO_3$); YPS (wobei Pepton in YTS durch die gleiche Menge Trypton ersetzt wurde); PS (Hefeextrakt und Trypton in YTS ersetzt durch 10 g/l Pepton); S (Hefeextrakt und Trypton in YTS ersetzt mit 2 bis 4 g/l $[NH_4]_2SO_4$). Das Volumen der Kultur betrug immer ein Zehntel bis ein Fünftel des Kolbenvolumens. Die E. coli-Stämme wurden im LB-Medium oder YT gezüchtet. Antibiotika und Kohlenhydrate wurden nach Bedarf zugesetzt. Die Molke war die „süße Molke" von Sigma. Sie enthielt 65% Lactose des Trockengewichts, 13% Protein, 8% Asche und 2% Milchsäure. Eine Lösung mit 30% (g/v) wurde 20 min lang bei 121 °C autoklaviert und bis zur Klarheit zentrifugiert. Der pH-Wert vor dem Autoklavieren und nach der Klärung betrug etwa 6. Zur Messung der Endkonzentration von Lactose wurde der Phenol-H_2SO_4-Test verwendet.

Herstellung und Analyse von DNA

[0052] Wegen Standardklonierungsverfahren wird auf Maniatis et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982) Cold Spring Harbor Laborstory, Cold Spring Harbor, New York, verwiesen. Die DNA wurde hergestellt mit dem Siedeverfahren oder dem Verfahren nach Birnboim und Doly (Nucleic Acids Res. (1979) 1: 1513–1523) und soweit erforderlich gereinigt durch Gleichgewichtssedimentation in Dichtegradienten von CsCl, welches Ethidiumbromid enthielt. Die Restriktionsenzyme und die DNA-Ligase wurden nach den Vorschriften des Herstellers eingesetzt. Die Transformation von E. coli-Zellen mit Plasmiden oder Ligationsgemischen entsprach dem Standard, wobei der konjugale Transfer von Plasmiden in X. campestris dem triparentalen Kreuzungsschema folgt (Ditta et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77: 7347–7351).

Isolation und Analyse von Xanthangummi

[0053] Zur Messung der Mengen von Xanthangummi wurden Kulturproben (ohne vorherige Entfernung von Zellen) zwei Volumina Isopropylalkohol zugesetzt. Das ausgefällte Material wurde durch Filtration auf What-Mann-Filtern 934-AH gesammelt, dann bei 80°C in einem Vakuumofen getrocknet und gewogen. Für Viskositätsmessungen wurde das getrocknete Präzipitat in einem Mörser gemahlen und durch ein Sieb von 250 µm gesiebt, bevor es in 0,1% (g/v) NaCl resuspendiert wurde. Die Viskosiätsmessungen über einen Bereich von Schergeschwindigkeiten wurden mit einem Brookfield-Viskosimeter LVT durchgeführt. Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem Protein Assay von BioRad und mit Standards aus Rinderserumalbumin (Sigma) durchgeführt.

Ergebnisse

Konstruktion von lactosepositivem X. campestris

[0054] Das Plasmid pGC9114 ist ein Derivat des Plasmids RP1 und trägt Tn951, ein Transposon, welches die Lactoseutilisierung vermittelt. Es wurde bewiesen, dass ein Unterfragment von pGC9114 von etwa 10,5 kbp, welches von den BamHI-Restriktionsstellen flankiert ist, die lac-Gene trägt. Dieses Fragment wurde zu pUC13 subtoniert Lac E. coli MC1009 zu Lac+ transformiert (blaue Kolonien auf Nährplatten, die Xgal und ITPG enthielten). Das gleiche Fragment mit" 10,5 kbp wurde in einen Plasmid-„Integrations"-Vektor (pSY1181) subkloniert, der von E. coli zu X. campestris konjugal transferiert wurde, jedoch im Letzteren nicht repliziert werden konnte. Wir bezeichnen dies einen „Integrations"-Vektor, weil die einzige Möglichkeit, dass diese lac-Gene in dem Rezipienten stabil gehalten werden können darin besteht, dass sie mit dem bakteriellen Chromosom rekombinieren und darin integriert werden. Die vier Schritte bei der Konstruktion der Plasmide pSY1181 und pSY1332 sind in **Fig.** 5 dargestellt und werden nachfolgend erläutert.

[0055] Um die Integration in das Chromosom zu unterstützen, wurde ein Fragment der chromosomalen DNA in pSY1232 eingebaut. Isolierte Fragmente des Chromosoms von wildem X. campestris, die die Synthese von Xanthangummi zu Mutanten komplementierten oder wiederherstellten, die zur Erzeugung des Polysaccharids

nicht befähigt sind, sind in Beispiel 1 beschrieben. Kolonien sowohl des wilden Typs als auch von Mutanten, die die auf Cosmidvektoren klonierten „Xanthan"-Gene trugen, waren mukoid, wogegen die Mutanten alleine nichtmukoid waren. Ein solches Klon war c1, ein Rekombinant zwischen dem Cosmidvektor pRK311 und einem Chromosomenfragment von etwa 22 kbp. Ein Derivat von c1, welches das Transposon Tn5 (Kanamycinresitenz) an einer Stelle innerhalb von c1 trug, die die Komplementierung von c1 für den korrespondieren Mutanten m1 nicht aktivierte, war unser Ausgangsmaterial. Wie in Schritt 1 von **Fig.** 5 gezeigt, wurde das Plasmid mit BamHI-Enzym eingeschränkt und rezirkularisiert, um eine einfache BamHI-Klonierungsstelle zur erzeugen, die flankiert war von der Komplementierungs-DNA von c1 und dem Kanamycinresistenzgen von Tn5. Der c1-Kan-Bereich wird von HindIII-Stellen gebunden.

[0056] Der zweite Schritt bestand in der Konvertierung des Plasmids pRK290 mit kreuzbarem Wirtsbereich durch Ersatz von oriV von pRK290 durch den Replikationsursprung von pUC13. Der dritte Schritt bestand im Fusionieren von c1-Kan mit pRKpUC über die HindIII-Stellen, um den „Integrations"-Vektor pSY1181 zu erzeugen. Der letzte Schritt bestand im Insertieren der lac-Gene an der BamHI-Stelle von pSY1181 zur Erzeugung von pSY1232. Mit pSY1232 transformiertes E. coli MC1009 ist resistent gegen Ampicillin und Kanamycin und erzeugt blaue Kolonien auf Platten, die Xgal und IPTG enthalten.

[0057] Damit X. campestris Lactose utilisieren kann, wurde pSY1232 in den Stamm X59 transferiert, wobei ein triparentales Konjugationsschema mit pRK2013 als Helferplasmid eingesetzt wurde (Ditta et al, op. cit.). Die X-Konjuganten wurden auf Kanamycin selektiert, weil X. campestris eine natürliche Ampicillinresistenz hat, das andere Resistenzgen trug auf pSY1232. Es zeigte sich, dass alle Kan^r-Exkonjuganten auf Minimalnährplatten auf Lactose wuchsen, nicht jedoch X59. Die Kan^r-Lac^+-Exkonjuganten waren ununterscheidbar, wobei eines, es wurde als X59-32 bezeichnet, als repräsentativ für die weitere Arbeit ausgewählt wurde. Ähnliche Ergebnisse wurden erhalten durch Mobilisieren des Lac^+-Plasmids pGC9114 in X59. in flüssigen Kulturen wurde gefunden, dass das plasmidtragende X59-pGC9114 langsamer wuchs als sowohl X59 oder X59-1232, deren Wachstum mit ähnlichen Geschwindigkeiten erfolgte. Diese langsamere Geschwindigkeit wird derzeit den „Kosten" beim Aufrechterhalten des Mehrfachkopie-Plasmids zugeschrieben.

[0058] Es wurde sogleich festgestellt, dass ohne Tetracyclinselektion das Plasmid pGC9114 aus einer Kultur von X59 verloren wurde, wogegen ohne Kanamycinselektion für den Stamm X59-1232 der kryptische Marker erhalten wurde. Viel wichtiger war, dass die Fähigkeit zur Lactoseutilisierung das gleiche Verhalten zeigte. Dies war konsistent, weil mindestens ein Teil der pSY1232-DNA stabil in das bakterielle Chromosom eingebaut war. Durch Analyse der DNA-Hybridisierung wurde bestätigt, dass das Plasmid mit engem Wirtsbereich in das Chromosom integriert war (Daten nicht gezeigt). Weiterhin waren die Stellen der Restriktionsfragmente konsistent mit der Insertion in den chromosomalen Bereich von c1. In ähnlicher Weise wird auch der Vektor pSY1181 in diesen Bereich integriert, so dass der Stamm resistent gegen Kanamycin wird.

Stabilität von integrierten Lactosegenen

[0059] Weil die Absicht insgesamt darin bestand, einen stabilen Stamm zum Konvertieren von Lactose in Xanthangummi zu erzeugen, wurde die Stabilität dieses Merkmals gemessen nach serienhaftem Subkultivieren von X59-pGC9114 und X59-1232 über viele Generationen ohne Tetracyclin zur Selektion von Plasmid pGC9114 oder Kanamycin im Fall von X59-1232. In beiden ist der Wirt X59 resistent gegen Rifampicin. Dies erlaubt eine Gegenselektion nach rifampicinempfindlicher, zufälliger Verunreinigung beim wiederholten, fortlaufenden Transfer. Jeder Stamm wurde sowohl in Glucose als auch in Lactose gezüchtet, wobei das Mengenverhältnis des aus Lactose erzeugten Xanthans zur Glucose berechnet wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 angegeben. Die Fähigkeit des das Plasmid tragenden Stamms X59 pGC9114 zum Konvertieren von Lactose in Xanthangummi nahm beim dritten Durchlauf auf die Hälfte des ursprünglichen Wertes ab. Im Gegensatz dazu zeigte X59-1232, welches die in das Chromosom eingebauten lac-Gene trug, bis zum Ende des Parallelexperiments (insgesamt 42 Generationen) eine stabile Umwandlung von Lactose in Xanthangummi.

Tabelle 4

Genetische Stabilität der Lactoseutilisierung für die Synthese von Xanthangummi							
Durchlauf Nr.	Generations-nummer[b]	Xanthangummi (Gew.-%)					
		X59pGC9114			X59-1232		
		Lac	Glc	Lac/Glc	Lac	Glc	Lac/Glc
0	7	1,6	2,0	0,8	1,6	1,9	0,8
1	14	1,7	2,0	0,9	1,7	2,0	0,9
3	28	0,6	1,5	0,4	1,5	1,7	0,9
4	35	0,1	1,8	0,1	1,5	2,0	0,8
5	42	0,2	1,7	0,1	1,7	2,2	0,8

[a] Die Inoculi wurden gezüchtet in YT plus Rifampicin (50 µg/ml) mit Tetracyclin (7,5 µg/ml) für X59pCG9114 oder Kanamycin (50 µg/ml) für X59-1232. Jeder Durchlauf erfolgte in YT plus Rifampicin mit einem Inokulum von 10^7 Zellen/ml und wurde bei etwa 10^9 Zellen/ml (optische Dichte 600 = 1) beendet. Nach jedem Durchlauf wurden die Schüttelkolben des YPS-Mediums mit Lactose oder Glucose (2 % g/v) mit 10^7 Zellen/ml inokuliert. Nach 48 h wurde die Menge an Xanthangummi in jedem Kolben gemessen, indem mit zwei Volumina Isopropylalkohol ausgefällt und dann getrocknet und gewogen wurde.

[b] Umfasst sieben Generationen pro Durchlauf und etwa sieben Generationen bei der Bestimmung der Kohlenhydratumwandlung.

Utilisierung eines Kohlenwasserstoffsubstrats für die Synthese von Xanthangummi

[0060] Es wurden parallele Kolben in Schüttelkolben von Stämmen X59 (Lac^-) und X59-1232 (Lac^+) auf die Utilisierung von Kohlenwasserstoffen für die Synthese von Xanthangummi untersucht. Die Messung der Exopolysaccharidakkumulation erfolgte mit Glucosemolke, Lactosemolke und geklärter Käsemolke bei äquivalenten Gewichtsprozenten von Glucose oder Lactose. Im Gegensatz zum stabilen Lac^+-Stamm X59-1232 zeigte der Lac^--Elternstamm X59 in geklärter Molke keine erkennbare Umwandlung von Lactose oder Lactose in Xanthangummi. Weil die Restemengen der Substrate aus Kohlenhydrat, Hefeextrakt, Trypton und Molke nicht bestimmt wurden, konnte die Absolutleistung der Umwandlung nicht berechnet werden. Jedoch sind die in Tabelle 7 gezeigten Mengen an Xanthangummi ähnlich denen der produktivsten Stämme X. campestris, die bei geregelter Fermentation mehr als 70% des Substrats in Xanthan umwandeln können.
[0061] Tabelle 5

Utilisierung von Kohlenwasserstoffsubstrat für die Synthese von Xanthangummi			
Stamm	Kohlenhydratsubstrat	Xanthangummi (Gew.-%)[a]	
		12 h	24 h
X59 (Lac$^-$)	Glucose	1,2	2,1
	Lactose	0,2	0,2
	Molke/Lactose	0,0	0,4
X59-1232 (Lac$^+$)	Glucose	1,1	2,0
	Lactose	1,6	2,0
	Molke/Lactose	1,70	1,8

[a] Die Inoculi wurden gezüchtet in YT-Medium mit Rifampicin (50 µg/l), zentrifugiert, mit LB-Medium gewaschen und 2x10^9 Zellen/ml davon in YTS-Medium plus Kohlenwasserstoffsubstrat (2 % g/v) resuspendiert. Es wurden Proben gezogen und das Xanthan mit zwei Volumina Isopropylalkohol ausgefällt und dann getrocknet und gewogen.

Qualität von aus Glucose, Lactose und geklärter Käsemolke erzeugtem Xanthangummi Die folgenden Kulturen wurden in Schüttelkolben gezüchtet, die 200 ml PS-Medium enthielten, welches mit 2% (g/v) der angegebenen Kohlenhydrate ergänzt war: Stamm X59, Glucose; X59-1232, Lactose; X59-1232, geklärter Käsemolke (Lactose). Nach einem Wachstum von 48 h wurden die Kulturen mit zwei Volumina Isopropylalkohol ausgefällt, getrocknet und bis zur einheitlichen Teilchengröße (etwa 100 bis 200 µm) gemahlen. Von jeder wurde ein bestimmter Gewichtsprozentsatz in 0,1% (g/v) NaCl resuspendiert, wobei die Gewichte unter Ausschluss von Wasser, Protein und Asche bestimmt wurden. Die Viskositäten wurden über einen Bereich der Schergeschindigkeiten gemessen, die Ergebnisse sind in **Fig.** 6 angegeben. Die Lösungsviskositäten des Xanthan enthaltenden Materials, welches durch X59 aus Glucose oder durch X59-1232 aus Lactose hergestellt wurde, waren nicht unterscheidbar. Jedoch erschien das in Anwesenheit von geklärter Molke hergestellte Material weniger viskos und erforderte nahezu das doppelte Gewicht, damit die gleiche Viskosität entstand. Es wurde ein Mischversuch durchgeführt, der zeigte, dass eine unbekannte Komponente in der geklärten Molke die Viskosiät von Xanthangummi herabsetzt. Es wurde eine getrennte Kultur von X59-1232 hergestellt, die auf PS-Medium plus Lactose gezüchtet wurde. Das Xanthan enthaltende Material wurde entweder in Anwesenheit oder in Abwesenheit von zugesetzter Molke ausgefällt. Dann wurde genügend geklärte Molke zugesetzt, damit sich eine Lactosekonzentration von 2% (g/v) ergab. Die bei diesem Mischversuch entstehenden Viskositäten sind in **Fig.** 6 hinzugefügt. Der größte Teil des offensichtlichen Qualitätsunterschieds ist auf den Einfluss der Glucose auf die Viskosität zurückzuführen.

Patentansprüche

1. Xanthomonas campestris-Stamm in biologisch reiner Kultur, wobei der Stamm:
(i) in Submerskultur Xanthanlösung produziert und
(ii) stabile, gesteigerte Lactose-Verwertungsaktivität aufweist, wobei die gesteigerte Aktivität durch in das Bakterienchromosom integrierte, exogene, genetische Information verliehen wird, welche Lactose-Verwertungsgene enthält, wobei das exogene genetische Material die Synthese von Xanthan regelnde, exogene DNA umfasst, und eine Restriktionskarte wie in **Fig.** 1 oder ein Segment davon aufweist, wobei die exogene DNA in E. coli-Stämmen mit den Hinterlegungsnummern ATCC67386, ATCC67387 und ATCC67388 enthalten ist.

2. Stamm nach Anspruch 1, worin die exogene DNA, welche die Synthese von Xanthan regelt zur Komplementierung einer negativen Xanthanlösungs-Synthese-Mutation fähig ist und eine Restriktionskarte von Segment c1H5, c1, c9H7, c82, c9 oder c9e aus **Fig.** 1 aufweist, worin die Xanthanlösungs-Produktion des Stammes höher ist als die Xanthanlösungs-Produktion, die unter denselben Bedingungen unter Verwendung eines Xanthomonas campestris-Stamms erzielt wird, der diese exogene DNA nicht enthält.

3. Stamm nach Anspruch 1, der zur Produktion von zumindest einem Gramm Xanthan pro Liter Nährmedium pro Stunde fähig ist.

4. Stamm nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin der Stamm in einem glucosefreien Nährmedium nicht mukoid und in einem glucosehaltigen Nährmedium mukoid ist.

5. Verfahren zum Erhalt des Stamms nach Anspruch 1, wobei das Verfahren die Verwendung eines Plasmids umfasst, welches
(i) die Lactose-Verwertungsgene und
(ii) eine DNA-Sequenz umfasst, die homolog zum Bakterienchromosom ist, worin das Plasmid die mit c1 bezeichnete DNA-Segzenz aus **Fig.** 1 enthält.

6. Verfahren nach Anspruch 5, worin das Plasmid das in **Fig.** 5 dargestellte Plasmid pSy1232 ist.

7. Verfahren zur Herstellung von Xanthanlösung, das die Kultivierung eines Xanthomonas campestris-Stamms in einem Nährmedium umfasst, wobei der Stamm:
(i) eine Xanthan-steigernde Modifikation aufweist, die eine in das Bakteriechromosom integrierte, exogene, genetische Information von Xanthomas campestris ist, welche die Synthese von Xanthan regelt, und
(ii) relativ zu Vorfahren des Stamms gesteigerte Lactase-Aktivität aufweist, worin die exogene genetische Information Lactose-Verwertungsgene umfasst, die für die gesteigerte Lactase-Aktivität verantwortlich sind, und eine Sequenz mit einer Restriktionskarte von **Fig.** 1, 3 oder ein Segment davon umfasst, wobei die Sequenz in E. coli-Stämmen mit den Hinterlegungsnummern ATCC67386, ATCC67387 und ATCC67388 enthalten ist.

8. Verfahren nach Anspruch 7, worin die exogene DNA, welche die Synthese von Xanthan regelt,
(i) zur Komplementierung einer negativen Xanthanlösungs-Synthese-Mutation fähig ist und
(ii) eine Restriktionskarte von Segment c1H5, c1, c9H7, c82, c9 oder c9e aus **Fig.** 1 aufweist, und worin die Xanthanlösungs-Produktion des Stammes höher ist als die Xanthanlösungs-Produktion, die unter denselben Bedingungen unter Verwendung eines Xanthomonas campestris-Stamms erzielt wird, der diese exogene DNA nicht enthält.

9. Verfahren nach Anspruch 7, worin das Xanthan aus dem Nährmedium isoliert wird.

10. Verfahren nach Anspruch 7, worin der Stamm zu Produktion von zumindest einem Gramm Xanthan pro Liter Nährmedium pro Stunde fähig ist.

11. Verfahren nach Anspruch 7, worin der Stamm in einem lactosehaltigen Nährmedium kuliviert wird.

12. Das in **Fig.** 5 dargestellte Plasmid pSY1232.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

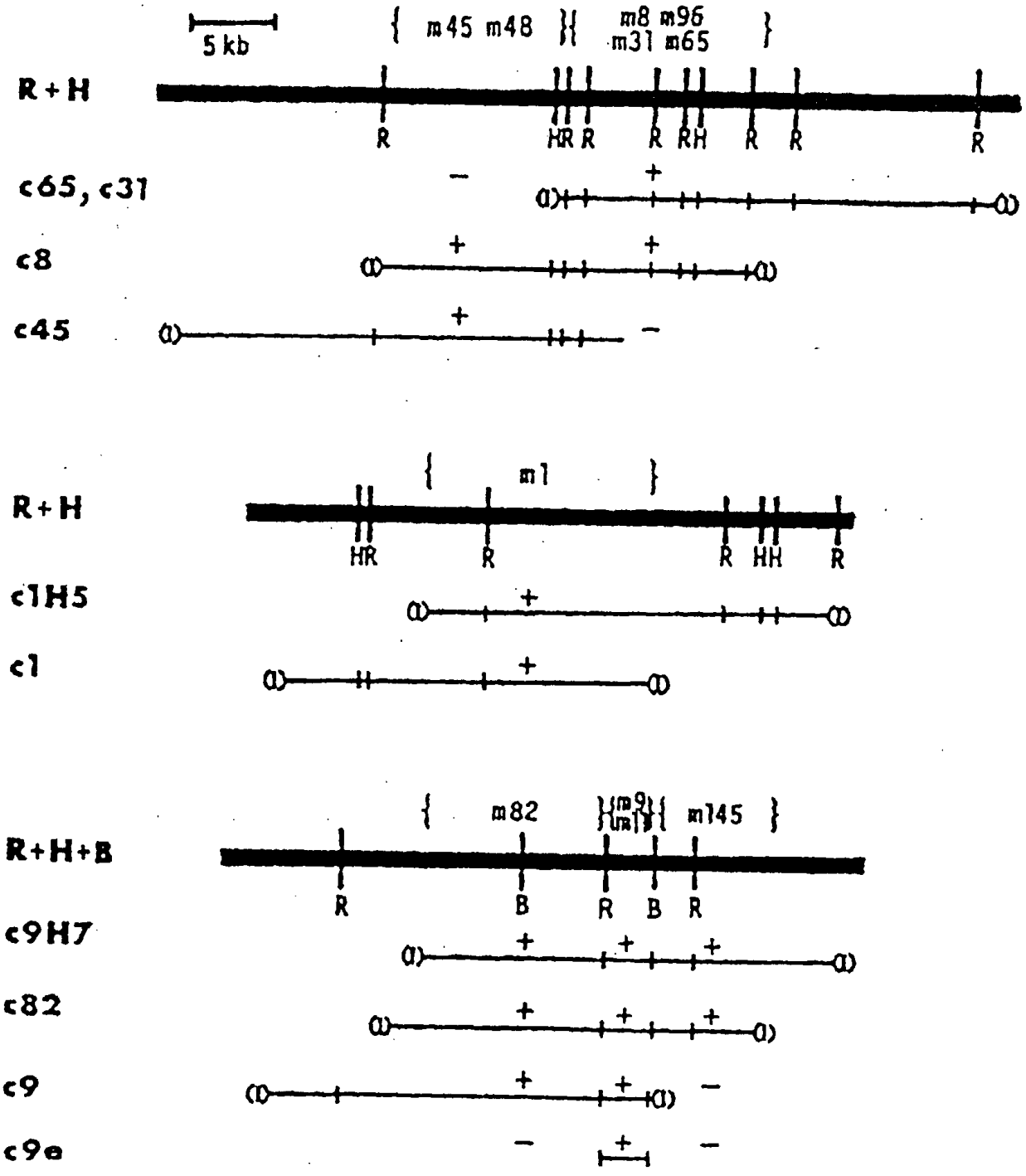


FIG. 2

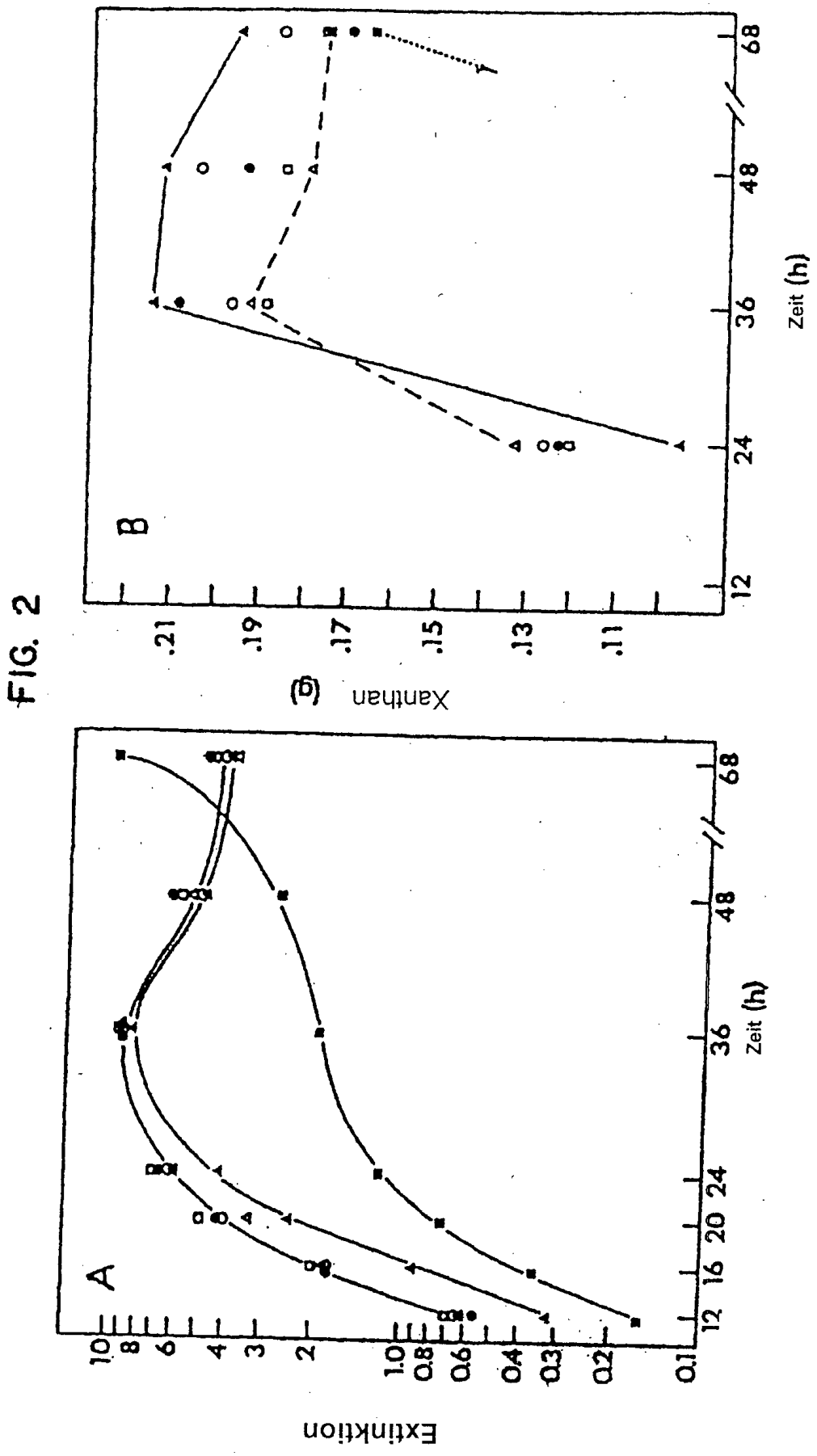
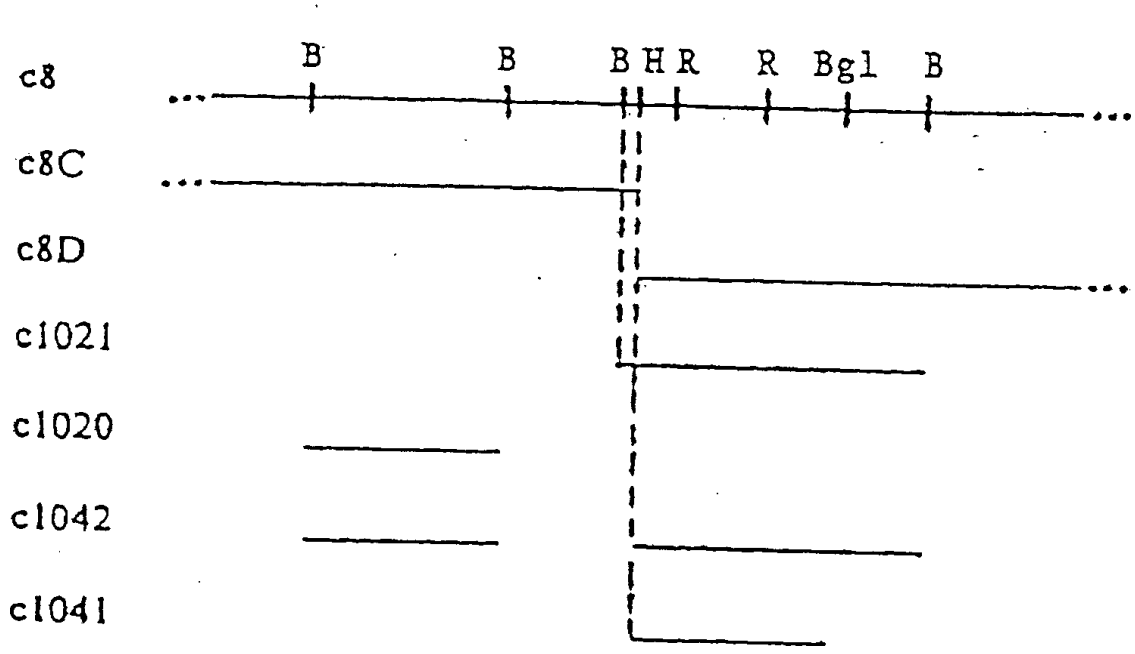

A
B
Extinktion
Xanthan (g)
Zeit (h)
Zeit (h)
10
8
6
4
3
2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.3
0.2
0.1
12
16
20
24
36
48
68
.21
.19
.17
.15
.13
.11

FIG. 3



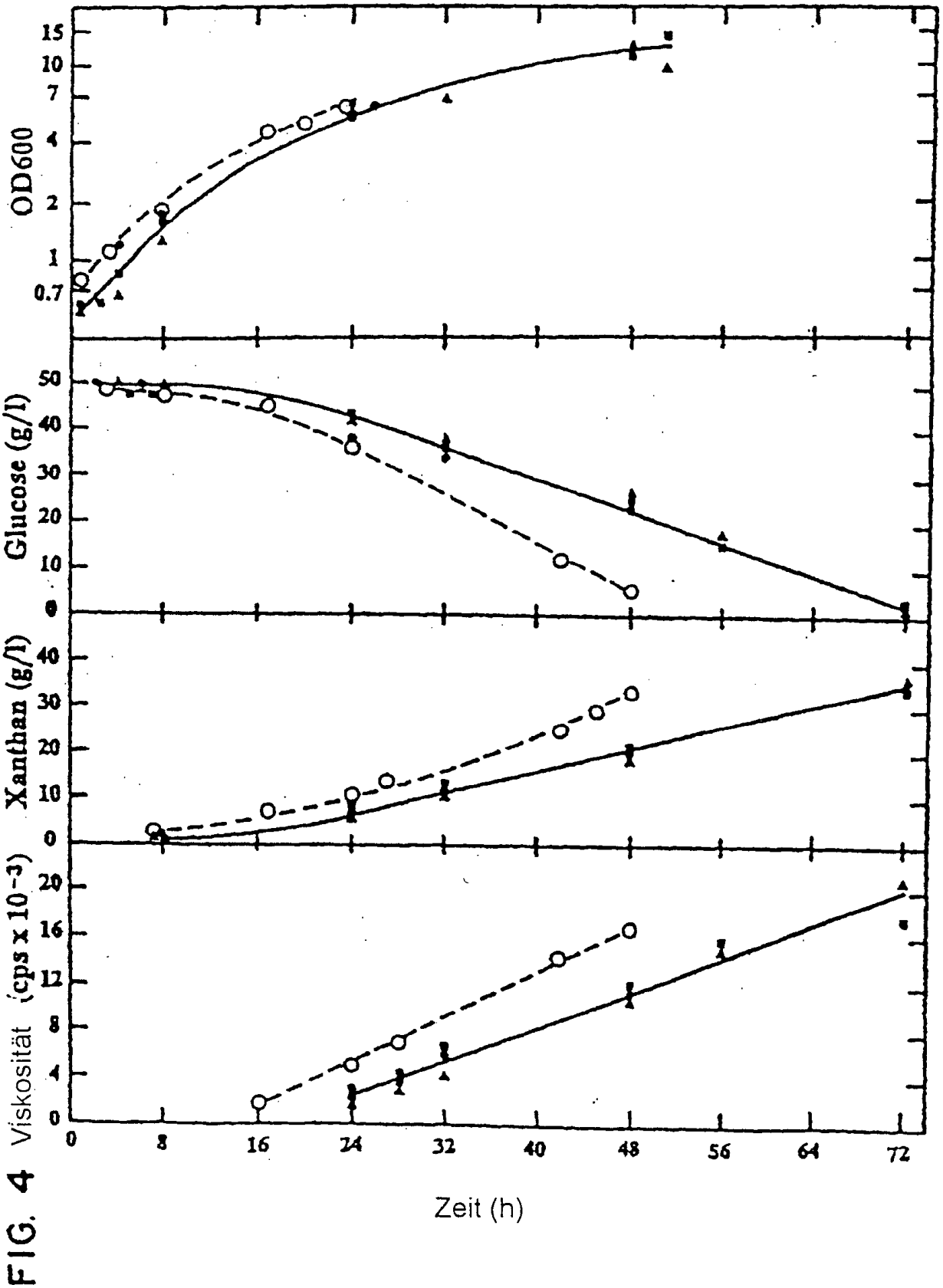

OD600
15
10
7
4
2
1
0.7
Glucose (g/l)
50
40
30
20
10
0
Xanthan (g/l)
40
30
20
10
0
Viskosität (cps x 10-3)
20
16
12
8
4
0
0
8
16
24
32
40
48
56
64
72
Zeit (h)

FIG. 4

FIG. 6

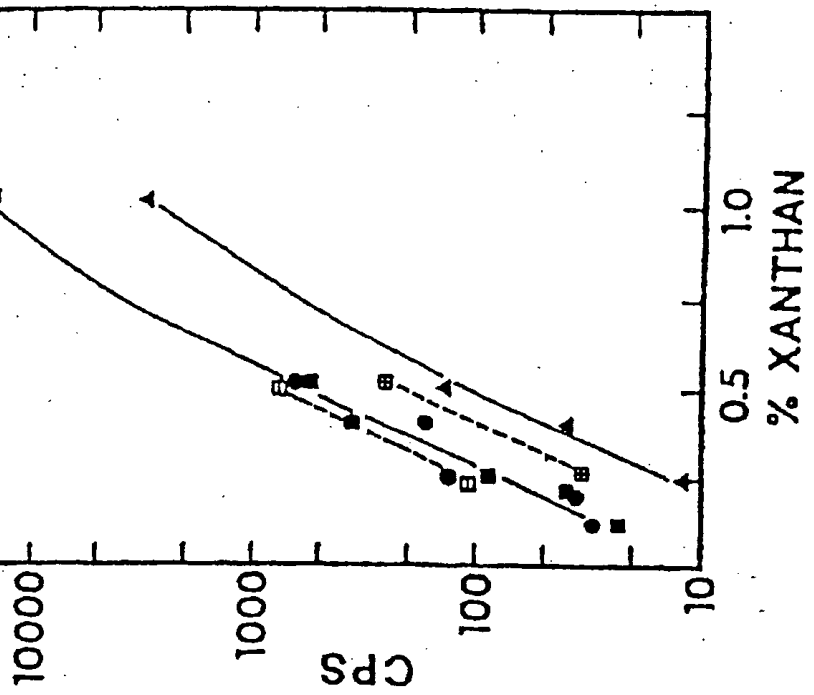
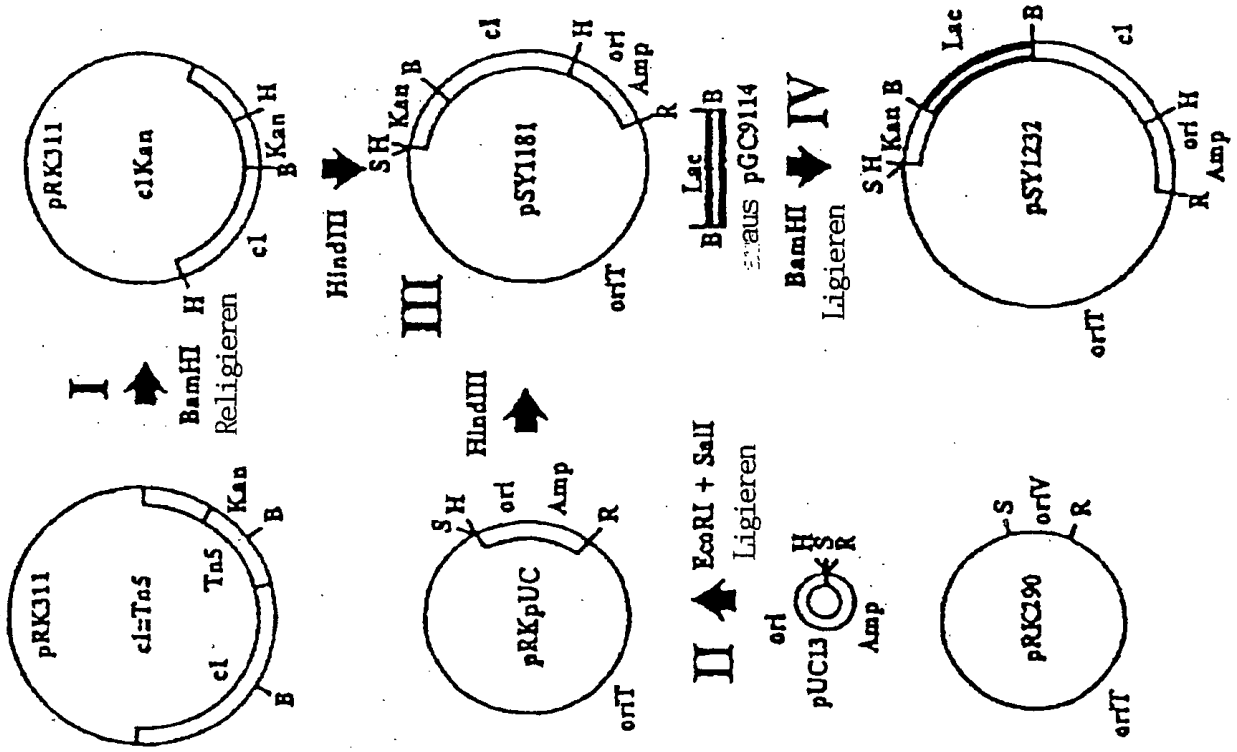

CPS
10000
1000
100
10
0.5
1.0
% XANTHAN

FIG. 5


pRK311
cI::Tn5
Tn5
Kan
B
cI
B
I
BamHI
H
Religieren
pRK311
cIKan
Kan
B
H
cI
B
II
EcoRI + SalI
Ligieren
pRKpUC
S
H
ori
Amp
R
oriT
pUC13
ori
Amp
HindIII
III
HindIII
S
H
Kan
B
cI
H
ori
Amp
R
pSY1181
oriT
Lac
B
B
aus pGC9114
IV
BamHI
Ligieren
S
H
Kan
B
Lac
B
cI
pSY1232
ori
H
Amp
R
oriT
pRK290
S
oriV
R
oriT