

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. Februar 2002 (14.02.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/12508 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12N 15/52**,
9/00, C07K 14/195, C12P 21/02

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/08687

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. Juli 2001 (27.07.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 38 776.4 9. August 2000 (09.08.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **BAYER AKTIENGESELLSCHAFT** [DE/DE];
51368 Leverkusen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **JOENTGEN, Win-
fried** [DE/DE]; Hoppegartenerstrasse 6, 50735 Köln (DE).
STEINBÜCHEL, Alexander [DE/DE]; Rönntenthal 27,
48341 Altenberge (DE). **OPPERMANN-SANIO, Fred,
Bernd** [DE/DE]; Finkenstrasse 27, 59075 Hamm (DE).
ABOULMAGD, Elsayed [EG/DE]; Horstmarer Landweg
84, 48149 Münster (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: **BAYER AKTIENGE-
SELLSCHAFT**; 51368 Leverkusen (DE).

Veröffentlicht:

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektro-
nischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Inter-
nationalen Büro erhältlich

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR IMPROVED PRODUCTION OF CYANOPHYCIN AND THE SECONDARY PRODUCTS THEREOF

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR VERBESSERTEN HERSTELLUNG VON CYANOPHYCIN UND DESSEN FOLGE-
PRODUKTE

(57) Abstract: The invention relates to thermostable cyanophycin synthetases and a method for the improved production of
cyanophycin and/or the secondary products thereof.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft thermostabile Cyanophycinsynthetasen sowie ein Verfahren zur ver-
besserten Herstellung von Cyanophycin und/oder dessen Folgeprodukten.



WO 02/12508 A2

Verfahren zur verbesserten Herstellung von Cyanophycin und dessen Folgeprodukte

5 Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf thermostabile Cyanophycin-Synthetasen, transformierte Organismen enthaltend ein solches Enzym sowie ein Verfahren zur verbesserten Herstellung von Cyanophycin und/oder dessen Folgeprodukten, beispielsweise Polyasparaginsäure oder Arginin.

10 Multi-L-Arginyl-Poly-L-Aspartat (Cyanophycin) ist ein verzweigtes Polypeptid, welches Asparaginsäure und Arginin in einem annähernd äquimolaren Verhältnis enthält. Die chemische Struktur entspricht einem Poly- α -Aspartat-Grundgerüst mit Arginin-Seitenresten, welche über Peptidbindungen an nahezu alle β -Carboxylgruppen des Grundgerüsts angeknüpft sind.

15

In der DE-A 198 25 509 ist die Identifizierung, Klonierung und heterologe Expression des Gens für die Cyanophycin-Synthetase aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 beschrieben. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgt hier mittels eines radioaktiven Tests bei dem L-[U- ^{14}C]-Arginin in als „Primer“ (Vorstufe) vorgelegtes
20 Cyanophycin aus *Synechocystis* sp. PCC 6308 eingebaut wird. Das Temperatur-optimum des Enzyms liegt hier bei 28°C.

20

Aus der DE-A 197 09 024 ist die Extraktion und Reinigung von Cyanophycin aus *Synechocystis* sp. PCC 6308 bekannt, wobei die Synthese bei 20°C durchgeführt
25 wird.

25

Die DE-A 198 13 692 offenbart lediglich die Isolierung des Cyanophycinsynthetasegens aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 oder *Anabaena variabilis* sp. ATCC 29413. Verfahrenstechnische Merkmale zur Herstellung von Cyanophycin sind hier
30 jedoch nicht beschrieben.

30

Aus FEMS Microbiology Letters 181 (1999) 229-236 ist die Herstellung von Cyanophycin mit *Synechococcus* sp. MA 19 bekannt. Das Syntheseezym wird jedoch dazu nicht beschrieben.

5 Nachteilig bei der Herstellung von Cyanophycin gemäß den bisher bekannten Verfahren ist, dass für eine optimale Produktausbeute ein relativ enger Temperaturbereich, in der Regel unterhalb von 35°C, nicht überschritten werden darf. Dies stellt eine erhebliche Einschränkung der Freiheitsgrade innerhalb der Prozessführung zur Herstellung von Cyanophycin und/oder dessen Folgeprodukten dar.

10

Daher ist eine Herstellung von Cyanophycin und/oder dessen Folgeprodukten auch bei wesentlich höheren Temperaturen als bislang beschrieben, verbunden mit einer höheren Flexibilität bei der Prozesssteuerung und erheblich verbesserten Produktausbeuten, wünschenswert.

15

Diese Aufgabe wird durch die vorliegende Erfindung gelöst.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Cyanophycin-Synthetasen mit einer erhöhten Stabilität und Aktivität im Temperaturbereich von > 35°C, dadurch gekennzeichnet, dass sie

20

a) eine Aminosäuresequenz gemäß SEQUENZPROTOKOLL 1 kodiert durch eine isolierte Nukleotidsequenz gemäß SEQUENZPROTOKOLL 2, ein Allel, Homolog oder Derivat dieser Nukleotidsequenz oder eine mit dieser

25 hybridisierende Nukleotidsequenz aufweisen und aus *Synechocystis* sp. PCC 6308 stammen, oder

b) dass sie eine Aminosäuresequenz gemäß SEQUENZPROTOKOLL 3 kodiert durch eine isolierte Nukleotidsequenz gemäß SEQUENZPROTOKOLL 4 ein

30 Allel, Homolog oder Derivat dieser Nukleotidsequenz oder eine mit dieser

hybridisierende Nukleotidsequenz aufweisen und aus *Synechococcus* sp. MA 19 stammen.

5 In einer bevorzugten Variante der vorliegenden Erfindung weisen die erfindungsgemäßen Cyanophycin-Synthetasen ein Temperaturoptimum im Bereich von 35°C bis 55°C, bevorzugt im Bereich von 35°C bis 50°C auf.

Die erfindungsgemäßen Cyanophycin-Synthetasen stellen thermostabile Enzyme dar.

10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Isoenzyme der erfindungsgemäßen Cyanophycin-Synthetasen. Hierunter sind Enzyme mit gleicher oder vergleichbarer Substrat- und Wirkungsspezifität zu verstehen, die jedoch eine unterschiedliche Primärstruktur aufweisen. Darüber hinaus umfasst die vorliegende Erfindung auch modifizierte Formen der Cyanophycin-Synthetasen. Hierunter sind erfindungsgemäß
15 Enzyme zu verstehen, bei denen Änderungen in der Sequenz, beispielsweise am N- und/oder C-Terminus des Polypeptids oder im Bereich konservierter Aminosäuren vorliegen, ohne jedoch die Funktion der Enzyme zu beeinträchtigen. Diese Veränderungen können durch den Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren nach bekannten Methoden vorgenommen werden.

20 Eine besondere Ausführungsvariante der vorliegenden Erfindung umfasst Varianten der erfindungsgemäßen Cyanophycin-Synthetasen, deren Substratspezifität beispielsweise durch Aminosäureaustausch, verglichen mit dem jeweiligen Ausgangsprotein, abgeschwächt oder verstärkt ist. Gleiches gilt für die Stabilität der erfindungsgemäßen Enzyme in den Zellen, die beispielsweise gegenüber dem Abbau durch Pro-
25 teasen verstärkt oder vermindert anfällig sind.

Ferner sind Polypeptide mit der Funktion einer Cyanophycin-Synthetase Gegenstand der vorliegenden Erfindung, die in ihrer Aminosäuresequenz derart verändert sind,
30 dass sie gegenüber regulatorisch wirkenden Verbindungen, beispielsweise die sie in

ihrer Aktivität regulierenden Stoffwechsel-Endprodukte desensitiv sind (feedback-desensitiv).

5 Unter einer isolierten Nukleotidsequenz oder einem isolierten Nukleinsäurefragment ist erfindungsgemäß ein Polymer aus RNA oder DNA zu verstehen, das einzel- oder doppelsträngig sein kann und optional natürliche, chemisch synthetisierte, modifizierte oder artifizielle Nukleotide enthalten kann. Der Begriff DNA-Polymer schließt hierbei auch genomische DNA, cDNA oder Mischungen davon ein.

10 Unter Allelen sind erfindungsgemäß funktionell äquivalente, d. h. im wesentlichen gleichwirkende Nukleotidsequenzen zu verstehen. Funktionell äquivalente Sequenzen sind solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz, beispielsweise durch die Degeneriertheit des genetischen Codes noch die gewünschten Funktionen besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende
15 Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z. B. durch chemische Synthese erhaltene und gegebenenfalls an den Kodon-Gebrauch des Wirtsorganismus angepasste Nukleotid-Sequenzen. Darüber hinaus umfassen funktionell äquivalente Sequenzen solche, die eine veränderte Nukleotidsequenz aufweisen, welche dem Enzym beispielsweise eine Desensitivität oder Resistenz gegenüber Inhibitoren verleiht.
20

Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten Sequenz, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigen. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen,
25 Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste.

Inbegriffen sind hier auch sogenannte Sinnmutationen (sense mutations), die auf Proteinebene beispielsweise zum Austausch konservierter Aminosäuren führen können, welche aber zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des
30 Proteins führen und somit funktionsneutral sind. Dies beinhaltet auch Veränderungen der Nukleotidsequenz, die auf Proteinebene den N- oder C-Terminus eines Proteins

betreffen, ohne jedoch die Funktion des Proteins wesentlich zu beeinträchtigen. Diese Veränderungen können sogar stabilisierenden Einfluss auf die Proteinstruktur ausüben.

- 5 Ferner werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfasst, welche man durch Modifikation der Nukleotidsequenz, resultierend in entsprechenden Derivaten, erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z. B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen kodierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme sein.
- 10 Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren Funktion, verglichen mit dem Ausgangs- bzw. Genfragment, abgeschwächt oder verstärkt ist.

- Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen Gegenstand der vorliegenden Erfindung, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschten Eigenschaften vermitteln und in
- 15 das Gen der erfindungsgemäßen Cyanophycin-Synthetase eingebaut oder angehängt werden können. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung von mittels computergestützten Programmen (molecular modelling) erstellten Proteinen oder durch in-vitro-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind kodierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung
- 20 einer Polypeptidsequenz gemäß der für den Wirtsorganismus spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit molekular-genetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bereits bekannter Gene des zu transformierenden Organismus leicht ermitteln.

- 25 Unter homologen Sequenzen sind erfindungsgemäß solche zu verstehen, die zu den erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen komplementär sind und/oder mit diesen hybridisieren. Der Begriff hybridisierende Sequenzen schließt erfindungsgemäß substantiell ähnliche Nukleotidsequenzen aus der Gruppe von DNA oder RNA ein, die unter bekannten stringenten Bedingungen eine spezifische Wechselwirkung
- 30 (Bindung) mit den zuvor genannten Nukleotidsequenzen eingehen. Hierzu zählen auch kurze Nukleotidsequenzen mit einer Länge von beispielsweise 10 bis 30, bevor-

zugt 12 bis 15 Nukleotiden. Dies umfasst erfindungsgemäß u. a. auch sogenannte Nukleotid-Primer oder Sonden.

5 Erfindungsgemäß sind auch die den kodierenden Bereichen (Strukturgenen) vorausgehenden (5'- oder upstream) und/oder nachfolgenden (3'- oder downstream) Sequenzbereiche eingeschlossen. Insbesondere sind hierin Sequenzbereiche mit regulatorischer Funktion inbegriffen. Sie können die Transkription, die RNA-Stabilität oder das RNA processing sowie die Translation beeinflussen. Beispiele für regulatorische Sequenzen sind u. a. Promotoren, Enhancer, Operatoren, Terminatoren
10 oder Translationsverstärker.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner eine Genstruktur enthaltend wenigstens eine der zuvor beschriebenen Nukleotidsequenzen kodierend für eine Cyanophycinsynthetase sowie mit diesen operativ verknüpfte regulatorische
15 Sequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenzen in der Wirtszelle steuern.

Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung beispielsweise von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer
20 regulatorischer Elemente derart, dass jedes der regulatorischen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Diese regulatorischen Nukleotidsequenzen können natürlichen Ursprungs sein oder durch chemische Synthese erhalten werden. Als Promotor ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Genexpression in dem entsprechenden Wirtsorganismus
25 steuern kann. Hierbei kann es sich erfindungsgemäß auch um einen chemisch induzierbaren Promotor handeln, durch den die Expression der ihm unterliegenden Gene in der Wirtszelle zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Beispielfhaft sei hier ein durch IPTG (Isopropyl- β -thiogalactopyranosid) induzierbarer Promotor genannt.

Die Herstellung einer Genstruktur erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit der erfindungsgemäßen Nukleotidsequenz nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie literatur bekannt sind. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung einen Vektor enthaltend wenigstens eine Nukleotidsequenz der zuvor beschriebenen Art kodierend für eine zur Herstellung von Cyanophycin spezifische Cyanophycin-Synthetase, mit dieser operativ verknüpfte regulative Nukleotidsequenzen sowie zusätzliche Nukleotidsequenzen zur Selektion transformierter Wirtszellen, für die Replikation innerhalb der Wirtszelle oder zur Integration in das entsprechende Wirtszell-Genom. Ferner kann der erfindungsgemäße Vektor eine Genstruktur der vorgenannten Art enthalten.

Als Vektoren eignen sich solche, die in Mikroorganismen, wie z. B. Bakterien, Pilzen und/oder Pflanzen repliziert werden. Bekannte Vektoren sind beispielsweise pBluescript (Stratagene, 11099 North Torrey Pines Red., La Jolla, CA 92 037, USA) oder pEK0 (Eikmanns, BJ. et al., Gene, 1991, 102: 93-98). Diese Aufzählung ist für die vorliegende Erfindung jedoch nicht limitierend.

Unter Ausnutzung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen können entsprechende Sonden oder auch Nukleotid-Primer synthetisiert und dazu verwendet werden, beispielsweise mit Hilfe der PCR-Technik analoge Gene aus anderen ein- oder mehrzelligen Organismen, bevorzugt Bakterien, Pilzen, Algen oder Pflanzen zu amplifizieren und isolieren.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit auch eine Sonde zur Identifizierung und/oder Isolierung von Genen kodierend für an der Biosynthese von Cyanophycin beteiligten Proteinen, bevorzugt weiteren thermostabilen Cyanophycinsynthetasen, wobei diese Sonde ausgehend von den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen der zuvor beschriebenen Art hergestellt wird und eine zur Detektion geeignete

Markierung enthält. Bei der Sonde kann es sich um einen Teilausschnitt der erfindungsgemäßen Sequenz, beispielsweise aus einem konservierten Bereich handeln, der z. B. eine Länge von 10 bis 30 oder bevorzugt 12 bis 15 Nukleotiden aufweist und unter stringenten Bedingungen spezifisch mit homologen Nukleotidsequenzen hybridisieren kann. Geeignete Markierungen sind aus der Literatur
5 zahlreich bekannt.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die Übertragung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz oder eines Teils davon kodierend für eine Cyanophycin-Synthetase, ein Allel, Homolog oder Derivat davon oder eine mit diesen Sequenzen
10 hybridisierende Nukleotidsequenz in ein heterologes Wirtssystem. Dies schließt auch die Übertragung eines erfindungsgemäßen Genkonstrukts oder Vektors in ein heterologes Wirtssystem ein.

Unter einem heterologen Wirtssystem ist erfindungsgemäß ein ein- oder mehrzelliger Organismus zu verstehen. Beispiele hierfür sind Mikroorganismen, Pilze, niedere oder höhere Pflanzen, Gewebe oder Zellen davon. Erfindungsgemäß bevorzugt sind Bakterien, besonders bevorzugt der Gattung der Enterobakterien und insbesondere der Art *Escherichia coli* oder coryneforme Bakterien, insbesondere der Gattung
20 *Corynebacterium* oder *Brevibacterium*, speziell *Corynebacterium glutamicum*.

Die Übertragung der erfindungsgemäßen Nukleotidsequenz kodierend für eine erfindungsgemäß thermostabile Cyanophycin-Synthetase in eine der zuvor genannten Wirtssysteme erfolgt nach bekannten Methoden. Als Beispiele für Verfahren zur
25 DNA-Übertragung in geeignete Wirtssysteme sind die Transformation, Elektroporation, Konjugation oder eine Agrobakterien-vermittelte DNA-Übertragung oder „particle bombardment“ zu nennen. Diese Aufzählungen dienen nur der Erläuterung der vorliegenden Erfindung und sind nicht limitierend.

Ein aus einer erfolgreich durchgeführten Nukleinsäureübertragung resultierender transformierter ein- oder mehrzelliger Organismus unterscheidet sich somit von dem

entsprechenden nicht transformierten Organismus dadurch, dass er zusätzliche Nukleinsäuren der erfindungsgemäßen Art enthält und entsprechend zur Ausprägung bringen kann.

5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit auch ein transformierter ein- oder mehrzelliger Organismus enthaltend eine erfindungsgemäße Cyanophycin-Synthetase und/oder einen Vektor enthaltend eine Cyanophycinsynthetase der zuvor beschriebenen Art.

10 Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Bereitstellung einer erfindungsgemäßen Cyanophycin-Synthetase der zuvor beschriebenen Art, wobei die für das Enzym kodierende Nukleotidsequenz aus einem ein- oder mehrzelligen Organismus isoliert wird, ggf. mit regulatorischen Strukturen operativ verknüpft und/oder in einen zur heterologen Expression geeigneten Vektor kloniert wird, ggf.
15 in ein heterologes Wirtssystem übertragen, dort exprimiert und anschließend aus diesem Wirtssystem isoliert und ggf. aufgereinigt und/oder angereichert wird.

Denkbar ist auch die direkte Isolierung einer für die Synthese von Cyanophycin ausreichenden Menge an Cyanophycin-Synthetasen der zuvor beschriebenen Art aus
20 einem Organismus, ohne die vorhergehende Anreicherung in einem heterologen System.

Im weiteren können dann die erfindungsgemäßen Enzyme der Cyanophycin-Synthetasen der zuvor beschriebenen Art beispielsweise in einem in-vitro System zur
25 Synthese von Cyanophycin und/oder dessen Folgeprodukte eingesetzt werden.

Insbesondere können Polyasparaginsäuren mit Hilfe einer Cyanophycin-Synthetase der zuvor beschriebenen Art in einer Weise modifiziert werden, dass Propfcopolymere entstehen, wenn man die Polyasparaginsäuren als Primer in die enzymatische
30 Polymerisationsreaktion einsetzt (Tabelle 1, Tabelle 2).

In Vitro Synthese von Pfropfcopolymeren des Cyanophycins

5 **Tabelle 1:** Einfluss von Asparaginsäure haltigen Polymeren auf den Einbau von Arginin durch die Cyanophycin-Synthetase aus *Synerhocystis* sp. PCC 6308

Als Primer verwendete Verbindung	Einbau von Arginin ^a [% des Maximalwertes]
Cyanophycin	100
Ohne Primer	0,2
Poly- α,β -D,L-Asparaginsäure ^b Mw: ~3500	97
Poly- α,β -D,L-Asparaginsäure ^b Mw: ~7500	49
Poly- α,β -D,L-Asparaginsäure ^b Mw: ~19000	25

10 a. Die Menge eingebauten Arginins wird nach Inkubation über Nacht nach der weiter unten beschriebenen Methode (Cyanophycin-Synthetase-Enzymtest, siehe unten) bestimmt. Die polymeren Primer werden in einer Endkonzentration von 0,87 mg/ ml der Reaktionsmischung zugesetzt.

15 b. Die Polyasparaginsäuren werden durch chemische Synthese aus Maleinsäure und Ammoniak bzw. aus Asparaginsäure hergestellt.

Tabelle 2: Einfluss von Asparaginsäure-haltigen Polymeren und N-Acetylglucosamin auf den Einbau von Arginin durch die gereinigte Cyanophycin-Synthetase aus *Synechococcus* sp. MA 19.

Als Primer verwendete Verbindung	Einbau von Arginin [% des Maximalwertes) ^c
Cyanophycin	100
Ohne Primer	0.1
Poly- α,β -D,L-Asparaginsäure ^b (Mw: ~3500)	6.9
N-Acetylglucosamin	1.8
α -Arginyl-Asparaginsäure-Dipeptid (Sigma lot 197FO334)	45.0

5

- c. Die Menge eingebauten Arginins wird nach Inkubation über Nacht nach der weiter unten beschriebenen Methode (Cyanophycin-Synthetase-Enzymtest) bestimmt. Die als Primer verwendeten Substanzen werden in einer Endkonzentration von 1.0 mg/ml eingesetzt.

10

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist außerdem ein Verfahren zur Herstellung von Cyanophycin und/oder dessen Folgeprodukte, wobei eine Cyanophycin-Synthetase und/oder ein Vektor und/oder ein transformierter ein- oder mehrzelliger Organismus der zuvor beschriebenen Art eingesetzt wird. Die vorliegende Erfindung umfasst jedoch nicht nur die Herstellung von Cyanophycin und/oder dessen Folgeprodukte in einem lebenden Wirtssystem, sondern auch die in-vitro Synthese von Cyanophycin mit Hilfe einer isolierten Cyanophycin-Synthetase der zuvor beschriebenen Art.

15

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Cyanophycin zeichnet sich dabei dadurch aus, dass die Enzym-katalysierte Synthese in einem Temperaturbereich von 20°C bis 60°C, bevorzugt in einem Bereich von 35°C bis 55°C, erfolgt. Der Einfluss der Temperatur auf die Aktivität und Stabilität der Enzyme aus

20

Synechocystis sp. PCC 6308 und aus *Synechococcus* sp. MA 19 ist in Fig. 2 bis 5 dargestellt. Wie in Fig. 5 ersichtlich, kann durch den Zusatz von Ectoin die Stabilität des Enzyms aus *Synechococcus* sp. MA 19 zusätzlich erhöht werden. Umg⁻¹ bedeutet die Einheit der spezifischen Aktivität in Einheiten (Units) pro mg Protein; im Falle der Cyanophycin-Synthetase ist 1 U = 1 nmol Arginin eingebaut in Cyanophycin pro Minute d.h. Umg⁻¹ = nmol · min⁻¹ · mg⁻¹.

Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich in vorteilhafter Weise dadurch aus, dass der Prozess aufgrund des weiten Temperaturbereichs, insbesondere oberhalb von 28°C weniger störanfällig ist, größere Variabilität bei der Prozessführung erlaubt und so eine verbesserte Produktausbeute liefert. Somit ist die erfindungsgemäße Herstellung von Cyanophycin und/oder dessen Folgeprodukte wesentlich reproduzierbarer und wirtschaftlicher als die bisher bekannten Verfahren.

Auf molekularer Ebene katalysiert die erfindungsgemäße Cyanophycin-Synthetase eine ATP-abhängige Kettenverlängerungsreaktion (Elongation). Hierzu sind beide Monomere, ATP, Mg²⁺, K⁺, ein Sulfhydrylreagenz sowie geringe Mengen an Cyanophycin als Primer erforderlich. Die Abhängigkeit der erfindungsgemäßen Cyanophycin-Synthetasen von ihren Substraten, Cosubstraten, Arginin-analogen Verbindungen und anderen Substanzen der unterschiedlichen Enzympräparationen sind in Tabelle 3, Tabelle 4 und Tabelle 5 dargestellt.

In Fig. 7 ist im besonderen der Einfluss von Arginin- und Asparaginsäure-ähnlichen Verbindungen auf den durch die gereinigte Cyanophycin-Synthetase aus *Synechocystis* sp. PCC 6308 katalysierten Einbau von Arginin und Asparaginsäure in Cyanophycin dargestellt. Hieraus ist klar ersichtlich, dass einerseits Canavanin und Lysin anstelle von Arginin und andererseits Asparaginsäure-β-Methylester und Asparagin anstelle von Asparaginsäure in das Polymer eingebaut werden können.

Tabelle 3: Abhängigkeit der Cyanophycin-Synthetase-Aktivität in der löslichen Zellfraktion von Substraten, Cosubstraten und dem Argininanalogon Canavanin ^d.

Bedingung	Enzymaktivität von	
	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6308	rekombinantem <i>E. coli</i>
	[% des Maximalwertes]	
Komplett	100	100
Ohne Enzym	<0.2	<0.2
Hitze-inaktivierter Extrakt ^e	<0.2	<0.2
Ohne ATP	<0.2	<0.2
Ohne Cyanophycin	2.5	0.9
Ohne L-Asparaginsäure	26.0	15.5
Ohne L-Arginin ^f	77.0	55.2
L-Glutaminsäure statt L-Arginin ^g	60.0	<0.2
L-Glutaminsäure statt L-Asparaginsäure ^h	36.0	1.6
L-Glutaminsäure als einziges Aminosäure-Substrat ^e	27.0	0.9
Plus 1 µM Canavanin	n. b.	40.0
Plus 10 µM Canavanin	n. b.	28.4
Plus 100 µM Canavanin	n. b.	12.1

d. Die Aktivitäten wurden bestimmt als Einbaurate der Aminosäure-Monomere in Cyanophycin innerhalb von 15 min nach Start der Reaktion in der löslichen Zellfraktion von *Synechocystis* PCC6308 und von IPTG-induzierten *E. coli* TOP 10 (pSK::*cphA_{co}*). Die Aktivitäten, die jeweils 100% entsprachen, betrugen 9.1 nmol Arginin min⁻¹ (g Protein)⁻¹ für *Synechocystis* PCC6308 bzw. 26.6 nmol Arginin min⁻¹ (g Protein)⁻¹ für *E. coli*.

e. Die lösliche Zellfraktion wurde 2 min bei 95°C inkubiert.

- f. Die Aktivität wurde bestimmt mit 0.1 mM L[U-¹⁴C] Asparaginsäure als Substrat.
- g. Die Aktivität wurde bestimmt mit 0.01 mM L[U-¹⁴C] Glutaminsäure als Substrat.
- h. Die Aktivität wurde bestimmt mit 0.1 mM L[U-¹⁴C] Glutaminsäure als Substrat.
- n. b., nicht bestimmt.

Tabelle 4: Einbau unterschiedlicher radiomarkierter Aminosäuren in Cyanophycin durch gereinigte Cyanophycin-Synthetase aus *Synechocystis sp.* PCC 6308.

5

Reaktionsgemisch ⁱ	Radiomarkierte Verbindung ^k	Enzymaktivität [% des Maximalwertes)
Komplett	L-[U- ¹⁴ C]-Arginin	100
Ohne L-Asparaginsäure	L-[U- ¹⁴ C]-Arginin	1.2
Ohne L-Arginin	L-[U- ¹⁴ C]-Asparaginsäure	2.4
Plus Canavanin	L-[U- ³ H]-Canavanin	12
L-Canavanin anstelle von L-Arginin	L-[U- ³ H]-Canavanin	13
L-Lysin anstelle von L-Arginin	L-[4,5- ³ H]-Lysin	15
L-Glutaminsäure anstelle von L-Arginin	L-[U- ¹⁴ C]-Glutaminsäure	0.1
L-Glutaminsäure anstelle von L-Asparaginsäure	L-[U- ¹⁴ C]-Glutaminsäure	0.3

- i. Das komplette Reaktionsgemisch ist im weiter unten beschriebenen Cyanophycin-Synthetase-Enzymtest aufgeführt.

- k. Die Endkonzentrationen der radiomarkierten Verbindungen sind wie folgt: L-[U-¹⁴C]-Arginin, 0.5 mM; L-[U-¹⁴C]-Asparaginsäure, 5 mM; L-[U-³H]-Canavanin, 1 mM; L-[4,5-³H]-Lysin, 1mM; L-[U-¹⁴C]-Glutaminsäure, 0.5 mM (wenn anstelle von L-Arginin eingesetzt), 5 mM (anstelle von L-Asparaginsäure eingesetzt).

Tabelle 5: Einbau unterschiedlicher radiomarkierter Aminosäuren in Cyanophycin durch gereinigte Cyanophycin-Synthetase aus *Synechococcus* sp. MA 19.

Bedingung ^l	Radiomarkierte Verbindung ^m	Enzymaktivität [% des Maximalwertes]
Komplett	L-[U- ¹⁴ C]-Arginin	100
Ohne L-Asparaginsäure	L-[U- ¹⁴ C]-Arginin	2.0
Ohne L-Arginin	L-[U- ¹⁴ C]-Asparaginsäure	5.0
L-Glutaminsäure anstelle von L-Asparaginsäure	L-[U- ¹⁴ C]-Arginin	3.0
L-Glutaminsäure anstelle von L-Arginin	L-[U- ¹⁴ C]-Glutaminsäure	n. d. ⁿ
β-Hydroxy-L-Asparaginsäure anstelle von L-Asparaginsäure	L-[U- ¹⁴ C]-Arginin	83.0
α-Arginyl-Asparaginsäure-Dipeptid (Sigma lot 197FO334) anstelle von L-Asparaginsäure	L-[U- ¹⁴ C]-Arginin	4.0
α-Arginyl-Asparaginsäure-Dipeptid (Sigma lot 197FO334) anstelle von L-Arginin	L-[U- ¹⁴ C]-Asparaginsäure	n. d.
L-Lysin anstelle von L-Arginin	L-[4,5- ³ H]-Lysin	2.7
L-Lysin anstelle von L-Asparaginsäure	L-[4,5- ³ H]-Lysin	n. d.
L-Canavanin anstelle von L-Arginin	L-[U- ¹⁴ C]-Asparaginsäure	62.0
L-Canavanin anstelle von L-Arginin	L-[U- ³ H]-Canavanin	58.0

- l. Das komplette Reaktionsgemisch ist im weiter unten beschriebenen Cyanophycin-Synthetase-Enzymtest aufgeführt.

m. Die Endkonzentrationen der radiomarkierten Verbindungen waren wie folgt:
L-[U-¹⁴C]-Asparaginsäure, 10 µM; alle anderen 5 µM.

5 n. n. d., nicht detektierbar.

Ohne die Zugabe von L-Aspartat zum Reaktionsansatz nimmt die anfängliche Rate der Cyanophycinsynthese in Extrakten von *Synechocystis* sp. PCC6308 drastisch ab. Ein Fehlen von L-Arginin führt lediglich zu einer moderaten Abnahme der Cyano-
10 phycinsynthese. Der zeitliche Verlauf des Einbaus dieser Aminosäure-Monomeren in das Cyanophycin ist in Fig. 1 dargestellt.

Hieraus ergibt sich, dass L-Aspartat nur am Polymerende angefügt wird. Für die weitere Elongation ist die Anwesenheit beider Monomere erforderlich.

15

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner ein verbesserter Cyanophycinsynthetase-Enzymtest verbunden mit einer verbesserten Abtrennung des enzymatisch gebildeten Cyanophycins aus dem Reaktionsansatz. Hierbei wird das gebildete Cyanophycin nach seiner Präzipitation aus dem Reaktionsansatz zunächst gewaschen
20 und der Niederschlag (pellet) danach in einem sauren wässrigen Medium resuspendiert. Dabei geht das Cyanophycin in Lösung und kann aus dem Überstand entnommen und direkt zur Konzentrationsbestimmung in einem Scintillationszähler eingesetzt werden. Diese Vorgehensweise zeichnet sich gegenüber den bekannten Methoden in vorteilhafter Weise dadurch aus, dass eine Vielzahl von Waschschr-
25 entfällt, kein Transfer von unlöslichem Cyanophycin erforderlich ist, die Menge an radioaktivem Abfall drastisch reduziert wird, das Cyanophycin durch die Solubilisierung unter sauren Bedingungen von weiteren Verunreinigungen im Präzipitat gereinigt wird und eine homogene Cyanophycinlösung zur Verfügung steht, aus der eine wesentlich exaktere und reproduzierbarere Bestimmung mittels Scintillations-
30 zählung erfolgen kann, als aus einer Dispersion, wie es bisher üblich war. Eine

vergleichende Gegenüberstellung der Isolierung von Cyanophycin aus dem Reaktionsansatz ist in Flussdiagrammen in Fig. 6 dargestellt.

- Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die Verwendung eines Vektors enthaltend eine erfindungsgemäße Cyanophycin-Synthetase der zuvor genannten Art zur Herstellung eines transformierten ein- oder mehrzelligen Organismus wie zuvor beschrieben. Ebenso ist die Verwendung eines solchen transformierten ein- oder mehrzelligen Organismus zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Cyanophycin-Synthetase und/oder zur Herstellung von Cyanophycin und/oder dessen Folgeprodukte in der vorliegenden Erfindung umfasst. Darüber hinaus kann auch eine erfindungsgemäß isolierte Cyanophycin-Synthetase zur in-vitro-Herstellung von Cyanophycin und/oder dessen Folgeprodukten Verwendung finden. Außerdem ist die Verwendung von Cyanophycin zur Herstellung von Nahrungsergänzungsmitteln und/oder Mitteln im Bereich der Agrarwirtschaft und/oder des Pflanzenschutzes in der vorliegenden Erfindung erfasst. Weitere Anwendungsbereiche des Cyanophycins und/oder dessen Folgeprodukte sind in der Papier-, Textil-, Pigment-, Lack-, Keramik-, Baustoff- oder Waschmittelindustrie zu sehen sowie in den Bereichen Wasser- und Abwasserbehandlung.
- Anwendungsbereiche der Folgeprodukte des Cyanophycins sind Mittel im Bereich der Agrarwirtschaft und/oder des Pflanzenschutzes, in der Papier-, Textil-, Pigment-, Lack-, Keramik-, Baustoff- oder Waschmittelindustrie sowie in den Bereichen Wasser- und Abwasserbehandlung.
- Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele näher charakterisiert, die jedoch nicht limitierend für die Erfindung sind:

Allgemeine Methoden:

Die Kultivierung von Mikroorganismen, wie z.B. *Escherichia coli* oder *Corynebacterium glutamicum* sowie die Herstellung von Zellextrakten erfolgte nach Standardmethoden beschrieben in Sambrook, J. et al. (1998, Molecular Cloning: A laboratory Manual; 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.) oder gemäß den Herstellerangaben. Als Bakterienstämme werden u.a. E. coli TOP 10 (Invitrogen, San Diego, USA) und *C. glutamicum*-Wildtyp DSM 20 300 verwendet. Die Kultivierung von Blaualgen, wie z. B. *Synechocystis* PCC 6308 erfolgte nach Beschreibungen in Rippka R. et al. (J. Gen. Microbiol, 1979, 111: 1-61). Für die Isolierung, Manipulation und den Transfer von DNA, die Polymerasekettenreaktion (PCR) sowie die Vorgehensweisen zur Analyse von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) sei ebenfalls auf Sambrook, J. et al. (1998, Molecular Cloning: A laboratory Manual; 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.) verwiesen.

15

Klonierung der Gene *cph A* und *cph B* aus *Synechocystis* PCC 6308

Die Gene *cphA*, kodierend für die Cyanophycin-Synthetase, und *cphB*, kodierend für die Cyanophycinase, wurden schrittweise aus der Gesamt-DNA von *Synechocystis* PCC6308 durch drei Polymerasekettenreaktionen (PCR) mit Hilfe der folgenden Oligonucleotide (Primer) amplifiziert: Primer P1 [5'-ATGGG(AGCT)CA(CT)AT(ACT)GT(ACT)GA(AG)CA(CT)GT-3'] und Primer P2 [5'-A(AG)(AGCT)GC(AG)TT(AGCT)GC(AGT)ATCAT(AG)AA-3'], die beide abgeleitet worden waren aus der konservierten Aminosäuresequenz MGHIVEHV und PFMIANA der Cyanophycin-Synthetasen aus *Anabaena variabilis* (Ziegler et al. 1998, Eur. J. Biochem. 254,154, 1998) und *Synechocystis* PCC6803 (Translationsprodukt des Offenen Leserahmens slr 2002 aus der Genbank CyanoBase, Kaneko et al. 1996, DNA Res. 3,109; www.kazusa.or.jp/cyano); Primer P3 [5'-ATGGG(AGCT)CA(CT)CA(CT)GATAT(CT)GC(AGCT)GG-3'], der abgeleitet worden war von der konservierten Aminosäuresequenz MGHHMIAG der Cyanophycinasen aus *A. variabilis* (Ziegler et al. 1998, Eur. J. Biochem. 254,154,

1998) und *Synechocystis* PCC6803 (Translationsprodukt des Offenen Leserahmens slr 2001, CyanoBase); Primer P4 (5'-TTGGCGATCATAAAAGGCGC-3'), dessen Sequenz komplementär ist zu der zentralen Region des *Synechocystis* sp. PCC6308 *cphA*-Gens; Primer P5 (5'-GCGCAAGTATCTTCATCGATACCAA-3'), dessen Sequenz komplementär ist zu der zentralen Region des *Synechocystis* sp. PCC6308 *cphB*-Gens und Primer P6 (5'-TGGCGGCGGTGTATGAAAAC-3'), dessen Sequenz einen Teil des *Synechocystis* sp. PCC6308 *cphA*-Gens darstellt. Für die heterologe Expression von *cphA* in *E. coli* wurde eine genomische Region, die das 3'-Ende von *cphB*, den intergenischen Bereich zwischen *cphB* und *cphA* und das komplette *cphA*-Gen umfasst, mit Hilfe von Primer P3 (siehe oben) und Primer P7 (5'-TTCAGAATTCACTACTCACTATTC-3'), dessen Sequenz komplementär ist zum 3'-Ende von *cphA*, amplifiziert. Die Primer wurden bezogen von MWG-Biotech AG (Ebersberg). Für die PCR wurde Vent DNA Polymerase (New England Biolabs, Schwalbach, Taunus) nach den Angaben des PCR application manual (Biochemica 1995, Boehringer Mannheim) verwendet. Die PCR-Produkte wurden nach elektrophoretischer Auftrennung aus Agarosegelen isoliert, mit *EcoRV*-linearisiertem Vektor pBluescript SK- (Stratagene Cloning Systems, San Diego, Calif., USA) ligiert und nach *E. coli* TOP 10 (Invitrogen, San Diego, Calif., USA) überführt.

Cyanophycin-Synthetase-Enzymtest

Die Methode stellt eine Modifizierung der von Ziegler et al. in Eur. J. Biochem. 254, 154 (1998) beschriebenen Methode dar. Das Reaktionsgemisch enthielt in einem
5 Gesamtvolumen von 0.125 ml 50 mM Tris, 20 mM MgCl₂, 20 mM KCl, 4 mM ATP, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 0.1 mM L-Asparaginsäure, 0.034 mM Chloramphenicol, 0.01 mM L-[U-14C]-Arginin (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg; spezifische Radioaktivität: 10.3 Gbq/mmol), 0.87 mg Cyanophycin pro ml (isoliert aus *Synechocystis* sp. PCC6308) und 0.2 bis 0.5 mg Protein aus der löslichen
10 Zellfraktion. Nach einer Inkubation von gewöhnlich 15 min bei einer Temperatur von gewöhnlich 28°C wurde das Reaktionsgemisch zum Abstoppen der Reaktion mit 1 ml eiskaltem Wasser versetzt. Das unter diesen Bedingungen unlösliche Cyanophycin wurde durch Zentrifugation (15 min, 14000 x g) abgetrennt und zwei-
mal mit je 1 ml 50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA (pH 8.2) gewaschen. Das Pellet
15 wurde in 1.0 ml 1.5 M HCl resuspendiert. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert. Vom Überstand, der das unter diesen Bedingungen lösliche Cyanophycin enthielt, wurden 0.5 ml entnommen und mit 5 ml LSC Szintillationscocktail HYDROLUMA (J. T. Baker, Deventer, Niederlande) vermischt. Die Radioaktivität wurde mit einem Szintillationsmessgerät Modell LS 6500 (Beckman Instruments GmbH, München)
20 gemessen.

Reinigung und Bestimmung von Cyanophycin

Die Isolierung von Cyanophycin aus lebenden Zellen von *Synechocystis* PCC 6308
25 oder heterologen Systemen erfolgt nach der Methode von Simon, R.D. (Biochim Biophys Acta, 1976, 422:407-418). Eine colorimetrische Quantifizierung des Cyanophycins erfolgt mit Sakagushi-Reagenz nach einer Methode beschrieben bei Allen, M.M. (Methods Enzymol., 1988, 167: 207-213). Die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung des Cyanophycins erfolgt mittels Hochdruckflüssig-
30 keitschromatographie (HPLC).

Legende zu den Figuren und Tabellen:

Fig. 1: SEQUENZPROTOKOLL 2 der Nukleotidsequenz des erfindungsgemäßen Cyanophycin-Synthetase-Gens kodierend für die erfindungsgemäße Cyanophycin-Synthetase aus *Synechocystis* PCC 6308.

Fig. 2: SEQUENZPROTOKOLL 1 der Aminosäuresequenz der erfindungsgemäßen thermostabilen Cyanophycin-Synthetase abgeleitet von dem entsprechenden Cyanophycin-Synthetase-Gen des *Synechocystis* PCC 6308.

Fig. 1: Zeitlicher Verlauf des Einbaus der Aminosäure-Monomere in Cyanophycin. Der eingebaute Gehalt an L-Arginin wurde zu bestimmten Zeiten (min) in einem Reaktionsansatz von insgesamt 125 µl bestimmt, der folgende Komponenten enthält: 1,25 nmol radioaktives L[U-¹⁴C]-Arginin, 12,5 nmol unmarkiertes L-Aspartat, 500 nmol ATP, 0,38 mg lösliches Zellprotein des in Anwesenheit von IPTG kultivierten, transformierten *E. coli* Stammes TOP 10 sowie 0,11 mg Cyanophycin als Primer (Δ). Der Gehalt an L[U-¹⁴C]-Asparagin, welches in Abwesenheit von L-Arginin eingebaut wird, wurde in Anwesenheit von 0,11 mg (□) oder 0,05 mg (·) Cyanophycin gemessen.

Fig. 2 und 3: Einfluß der Temperatur auf den durch die gereinigte Cyanophycin-Synthetase aus *Synechocystis* sp. PCC 6308 katalysierten Einbau von Arginin in Cyanophycin. Fig. 3a) Cyanophycin-Synthetase-Aktivität als Funktion der Inkubationstemperatur. Die Enzymaktivität wurde in einem Zeitintervall von 4 min nach Start der Reaktion bei der angegebenen Temperatur bestimmt. Fig. 3b) Zeitlicher Verlauf des Einbaus von Arginin in Cyanophycin bei 28°C (-□-) und bei 50°C (-●-). Die eingebaute Menge an Arginin wurde zu den angegebenen Zeitpunkten in jeweils 125 µl Reaktionsgemisch bestimmt.

30

- Fig. 4: Temperaturprofil (-●-) und Hitzestabilität (-◆-) der gereinigten Cyanophycin-Synthetase aus *Synechococcus* sp. MA 19. Für das Temperaturprofil wurden die Enzymaktivitäten jeweils in einem Zeitintervall von 15 min nach Start der Reaktion bei der angegebenen Temperatur bestimmt. Die Hitzestabilität des Enzyms wurde ermittelt als Aktivität (gemessen bei 28°C) nach jeweils 30 min Inkubation der Enzymlösung bei den angegebenen Temperaturen.
- Fig. 5: Stabilität der gereinigten Cyanophycin-Synthetase aus *Synechococcus* sp. MA 19 bei 50°C als Funktion der Inkubationszeit in Abwesenheit (-◆-) und Gegenwart (-■-) von 1 M Ectoin. Das Enzympräparat wurde bei 50°C inkubiert, und zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Aktivität bestimmt (bei 28°C).
- Fig. 6: Flussdiagramme der Isolierungen von Cyanophycin aus dem Reaktionsansatz im Vergleich (A) nach Simon, R.D. (Biochim Biophys Acta, 1976, 422:407-418), (B) nach Ziegler, K. et al. (Eur. J. Biochem., 1998, 254: 154-159) und (C) nach dem erfindungsgemäßen Verfahren. Die unlöslichen Cyanophycingranulae sind als Kugeln dargestellt; Transferschritte sind durch gebogene Pfeile dargestellt.
- SEQUENZPROTOKOLL 4 der Nukleotidsequenz des erfindungsgemäßen Cyanophycin-Synthetase-Gens kodierend für die erfindungsgemäße Cyanophycin-Synthetase aus *Synechococcus* sp MA 19.
- SEQUENZPROTOKOLL 3 der Nukleotidsequenz der erfindungsgemäßen thermostabilen Cyanophycin-Synthetase abgeleitet vom entsprechenden Cyanophycin-Synthetase-Gen des *Synechococcus* sp MA 19.
- Fig. 7a und 7b: Einfluss von Verbindungen, die strukturelle Ähnlichkeit zu Asparaginsäure und Arginin aufweisen. Fig. 7a) Einbau von Asparaginsäure

(Schraffierte Säulen) und Arginin (schattierte Säulen) nach Zusatz von 5 mM der angegebene Verbindung zum ansonsten kompletten Reaktionsgemisch. Fig. 7b) Einfluss der angegebenen Verbindungen, wenn diese in einer Konzentration von 5 mM anstelle von Asparaginsäure (schraffierte Säulen) bzw. in einer Konzentration von 0.5 mM anstelle von Arginin in das Reaktionsgemisch gegeben wurden.

Die Abkürzungen der Aminosäuren werden nach der Standard Ein-Buchstaben-Methode festgelegt.

Patentansprüche:

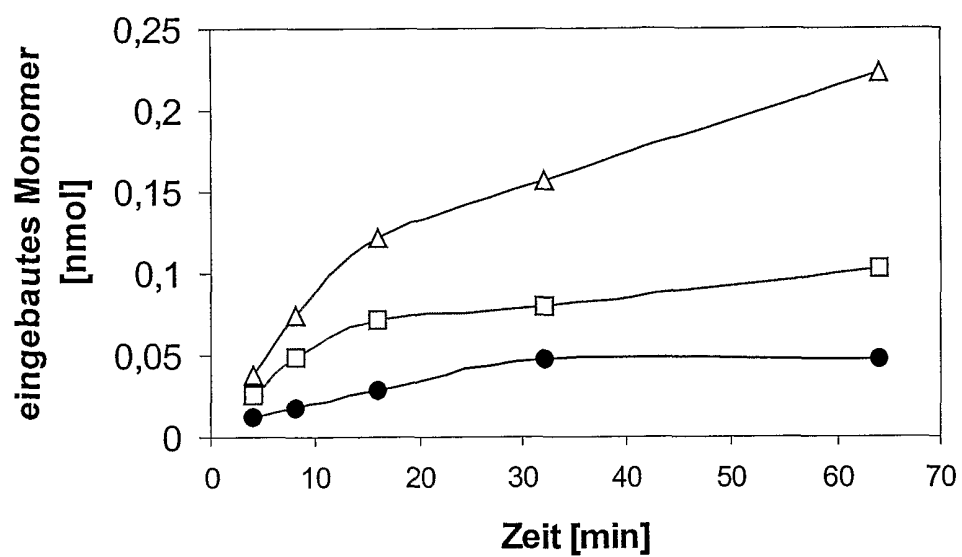
1. Cyanophycin-Synthetasen mit einer Aktivität innerhalb eines Temperaturbereichs von 35°C bis 55°C, dadurch gekennzeichnet, dass sie
 - a) eine Aminosäuresequenz gemäß SEQUENZPROTOKOLL 1 kodiert durch eine isolierte Nukleotidsequenz gemäß SEQUENZPROTOKOLL 2 ein Allel, Homolog oder Derivat dieser Nukleotidsequenz oder eine mit dieser hybridisierende Nukleotidsequenz aufweisen und aus *Synechocystis* PCC 6308 stammen oder
 - b) dass sie eine Aminosäuresequenz gemäß SEQUENZPROTOKOLL 3 kodiert durch eine isolierte Nukleotidsequenz gemäß SEQUENZPROTOKOLL 4, ein Allel, Homolog oder Derivat dieser Nukleotidsequenz oder eine mit dieser hybridisierende Nukleotid-Sequenz aufweisen und aus *Synechococcus* sp. MA 19 stammen.
2. Vektor enthaltend wenigstens eine Nukleotidsequenz kodierend für eine zur Herstellung von Cyanophycin spezifische Cyanophycin-Synthetase gemäß Anspruch 1.
3. Transformierter ein- oder mehrzelliger Organismus enthaltend eine Cyanophycin-Synthetase gemäß Anspruch 1 und/oder einen Vektor gemäß Anspruch 2.
4. Transformierter ein- oder mehrzelliger Organismus gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass er ein Mikroorganismus, ein Pilz, eine niedere oder höhere Pflanze, Gewebe oder eine Zelle davon ist.

5. Transformierter Organismus gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass er ein Bakterium der Gattung der Enterobakterien oder der coryneformen Bakterien ist.
- 5 6. Verfahren zur Bereitstellung einer Cyanophycin-Synthetase gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die für das Enzym kodierende Nukleotidsequenz mit regulatorischen Strukturen operativ verknüpft und/oder in einen zur heterologen Expression geeigneten Vektor kloniert wird, in ein heterologes Wirtssystem übertragen, exprimiert und aus diesem Wirtssystem
10 isoliert und aufgereinigt und/oder angereichert wird.
7. Verfahren zur Herstellung von Cyanophycin und den daraus herzustellenden Folgeprodukten, dadurch gekennzeichnet, dass eine Cyanophycin-Synthetase gemäß Anspruch 1 und/oder ein Vektor gemäß Anspruch 2 und/oder ein
15 transformierter ein- oder mehrzelliger Organismus gemäß einem der Ansprüche 3 bis 5 eingesetzt wird.
8. Verwendung eines Vektors gemäß Anspruch 2 zur Herstellung eines transformierten ein- oder mehrzelligen Organismus gemäß einem der Ansprüche 3
20 bis 5.
9. Verwendung eines transformierten ein- oder mehrzelligen Organismus gemäß einem der Ansprüche 3 bis 5 zur Herstellung einer Cyanophycin-Synthetase gemäß Anspruch 1 und/oder zur Herstellung von Cyanophycin.
25
10. Verwendung einer Cyanophycin-Synthetase gemäß Anspruch 1 zur Herstellung von Cyanophycin.
11. Isoenzyme und modifizierte Formen der Cyanophycin-Synthetase, dadurch
30 gekennzeichnet, dass diese durch Modifikation der Cyanophycin-Synthetase von *Synechocystis* PCC 6308 erhalten werden.

12. Isoenzyme und modifizierte Formen der Cyanophycin-Synthetase gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass diese durch Aminosäureaustausch erhalten werden.
- 5
13. Isoenzyme und modifizierte Formen der Cyanophycin-Synthetase gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass der Aminosäureaustausch durch Modifikation der Nukleotidsequenz des zugrundeliegenden Gens erfolgt.
- 10
14. Artifizielle DNA-Sequenzen, dadurch gekennzeichnet, dass diese in das Gen der Cyanophycin-Synthetase gemäß Anspruch 1 eingebaut oder angehängt werden.
- 15
15. Heterologe Wirtssysteme enthaltend eine Nukleinsäuresequenz oder einen Teil davon kodierend für eine Cyanophycin-Synthetase, ein Isoenzym oder eine modifizierte Form davon gemäß der Ansprüche 1 und 11.
- 20
16. Verwendung von Cyanophycin hergestellt nach Anspruch 10 zur Synthese von Polyasparaginsäure oder Arginin.
- 25
17. Verwendung der Cyanophycin-Synthetase in vitro zur Erzeugung von Polyasparaginsäure-Cyanophycin Pfropfpolymeren.
18. Verwendung von Cyanophycin zur Herstellung von Nahrungsergänzungsmitteln und/oder Mitteln im Bereich der Agrarwirtschaft und/oder des Pflanzenschutzes und/oder in der Papier-, Textil-, Pigment-, Lack-, Keramik-, Baustoff- oder Waschmittelindustrie sowie in den Bereichen Wasser- und Abwasserbehandlung.
- 30
19. Verwendung von Folgeprodukten des Cyanophycins zur Herstellung von Mitteln im Bereich der Agrarwirtschaft und/oder des Pflanzenschutzes

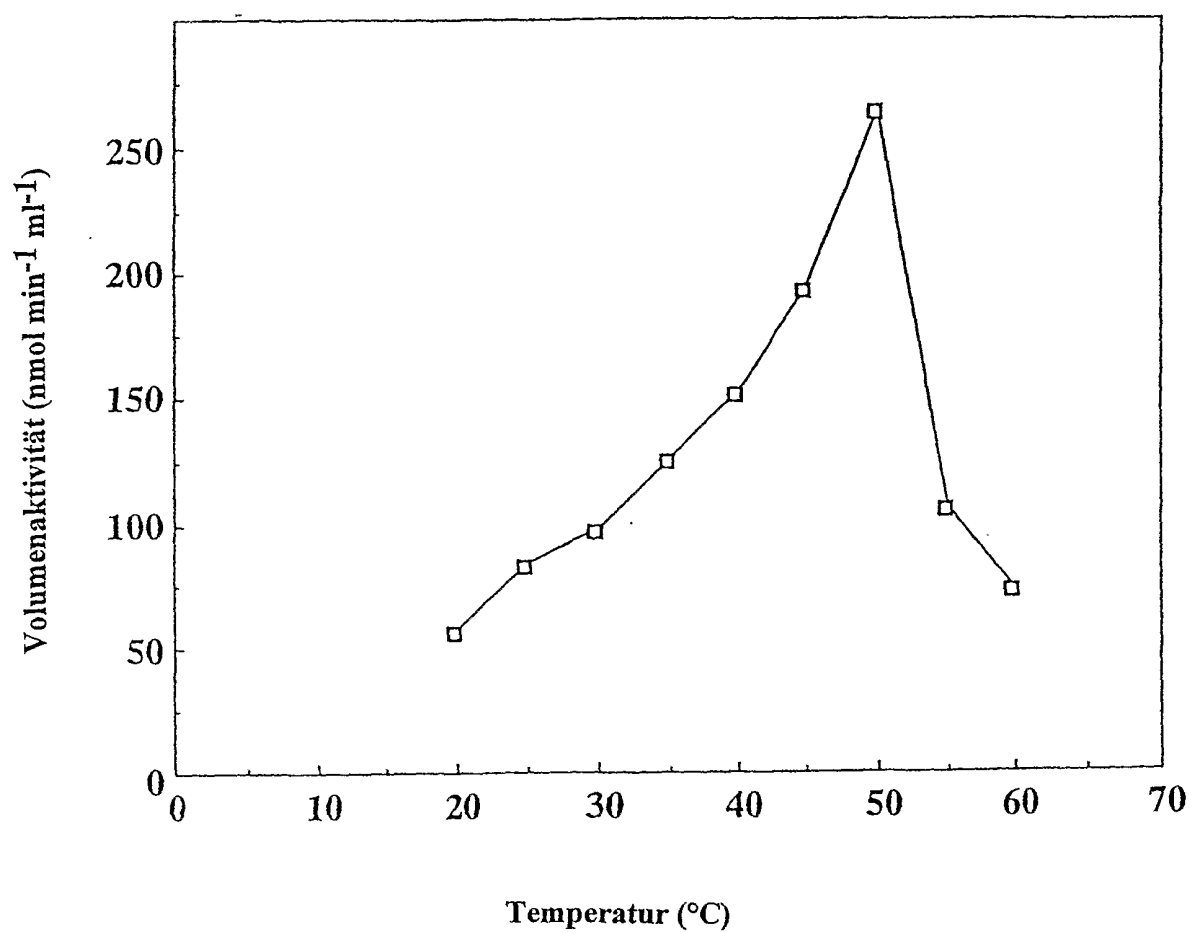
und/oder in der Papier-, Textil-, Pigment-, Lack-, Keramik-, Baustoff- oder Waschmittelindustrie sowie in den Bereichen Wasser- und Abwasserbehandlung.

Fig. 1



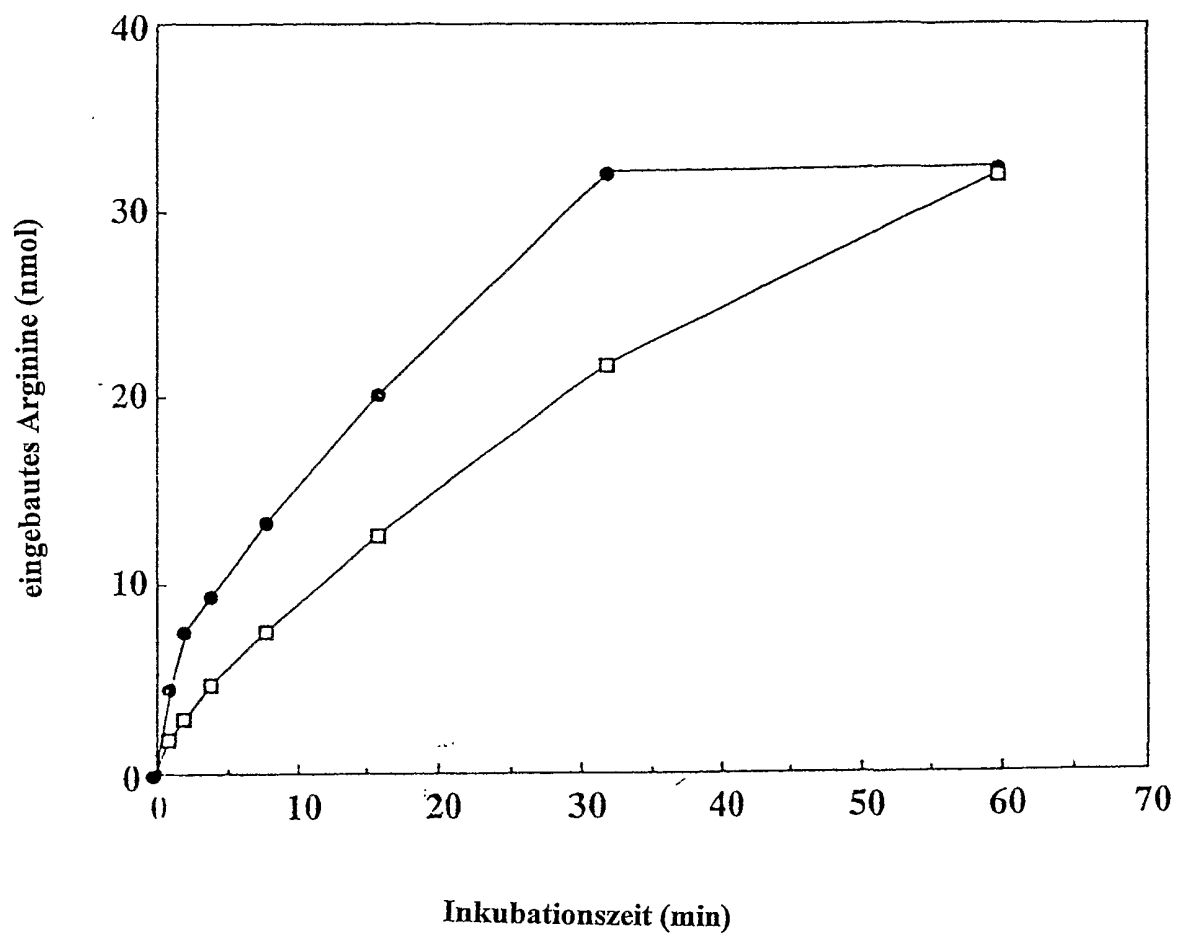
- 2/7 -

Fig. 2



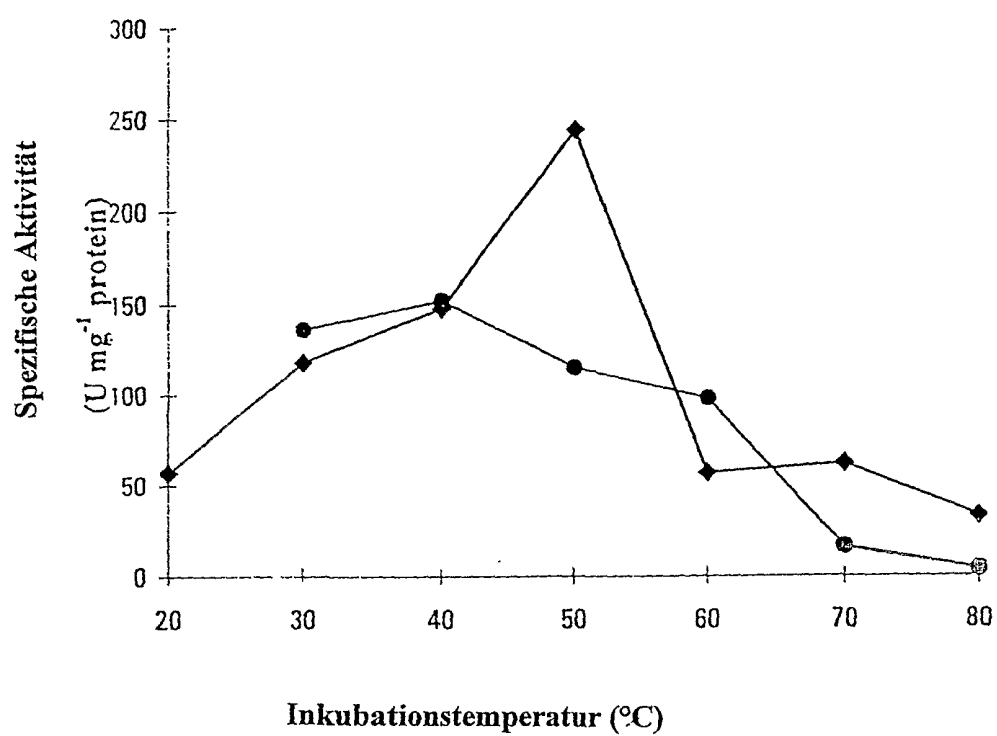
- 3/7 -

Fig. 3



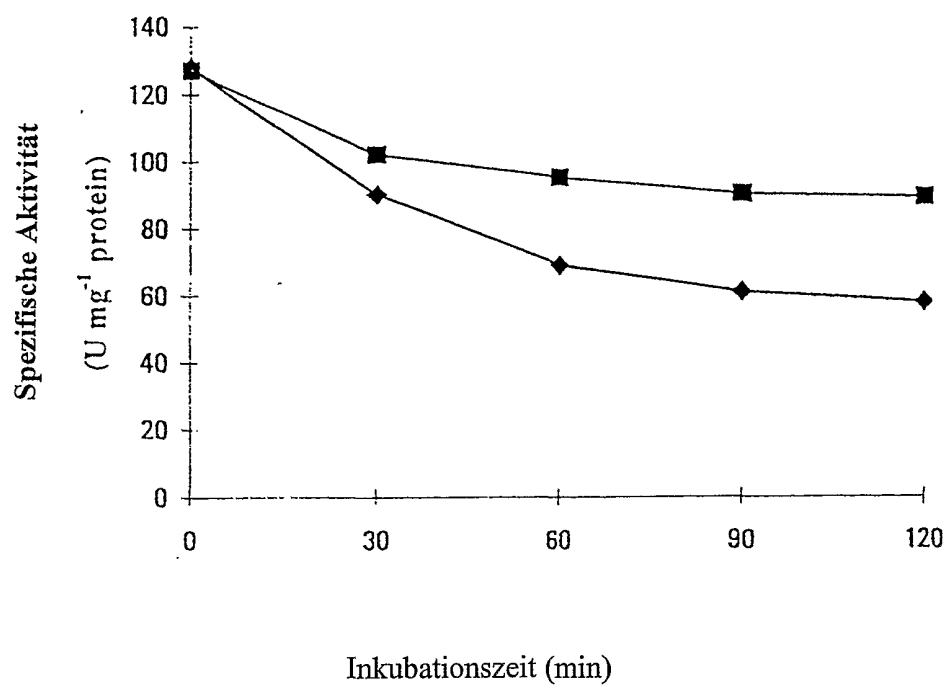
- 4/7 -

Fig. 4



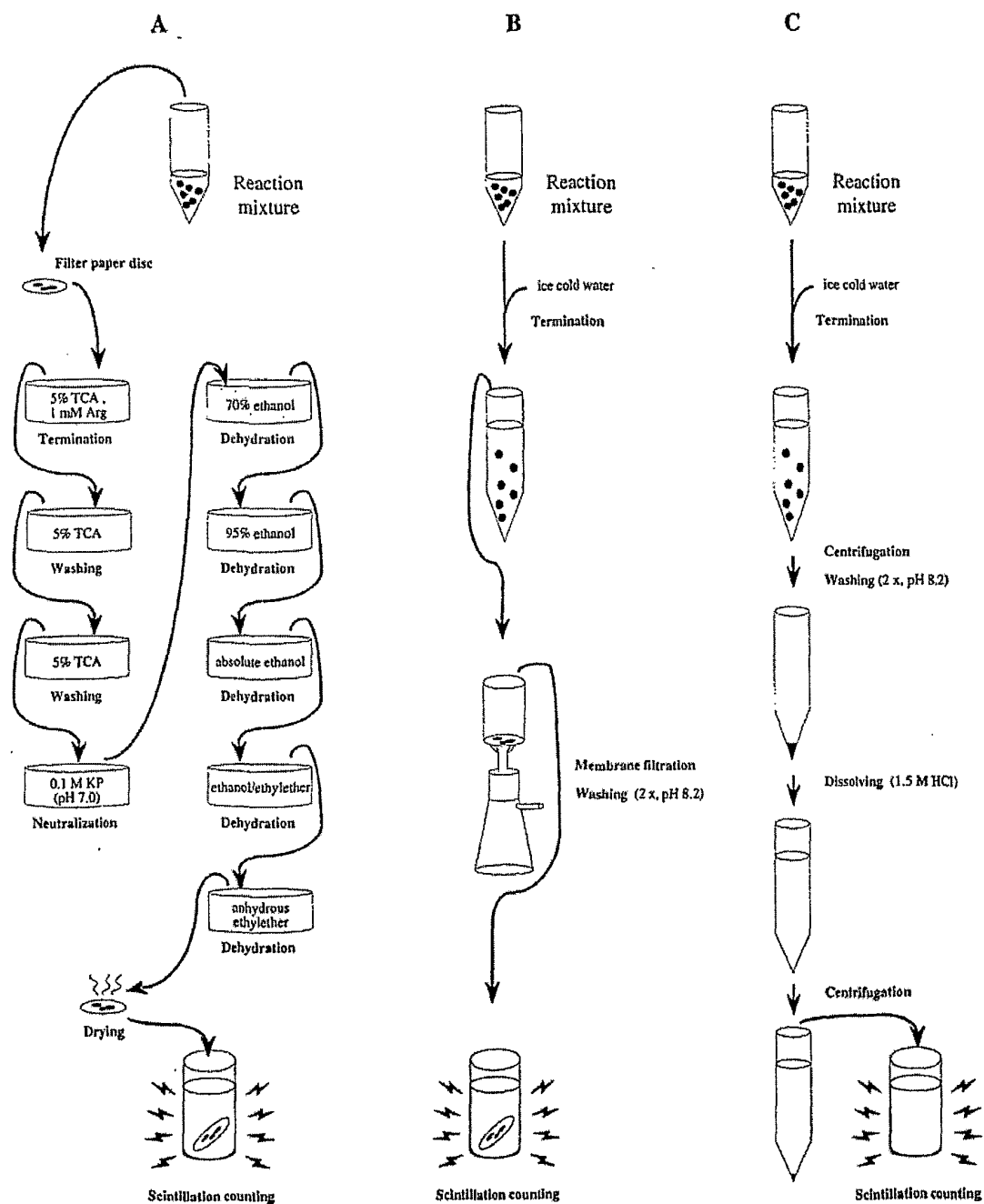
- 5/7 -

Fig. 5

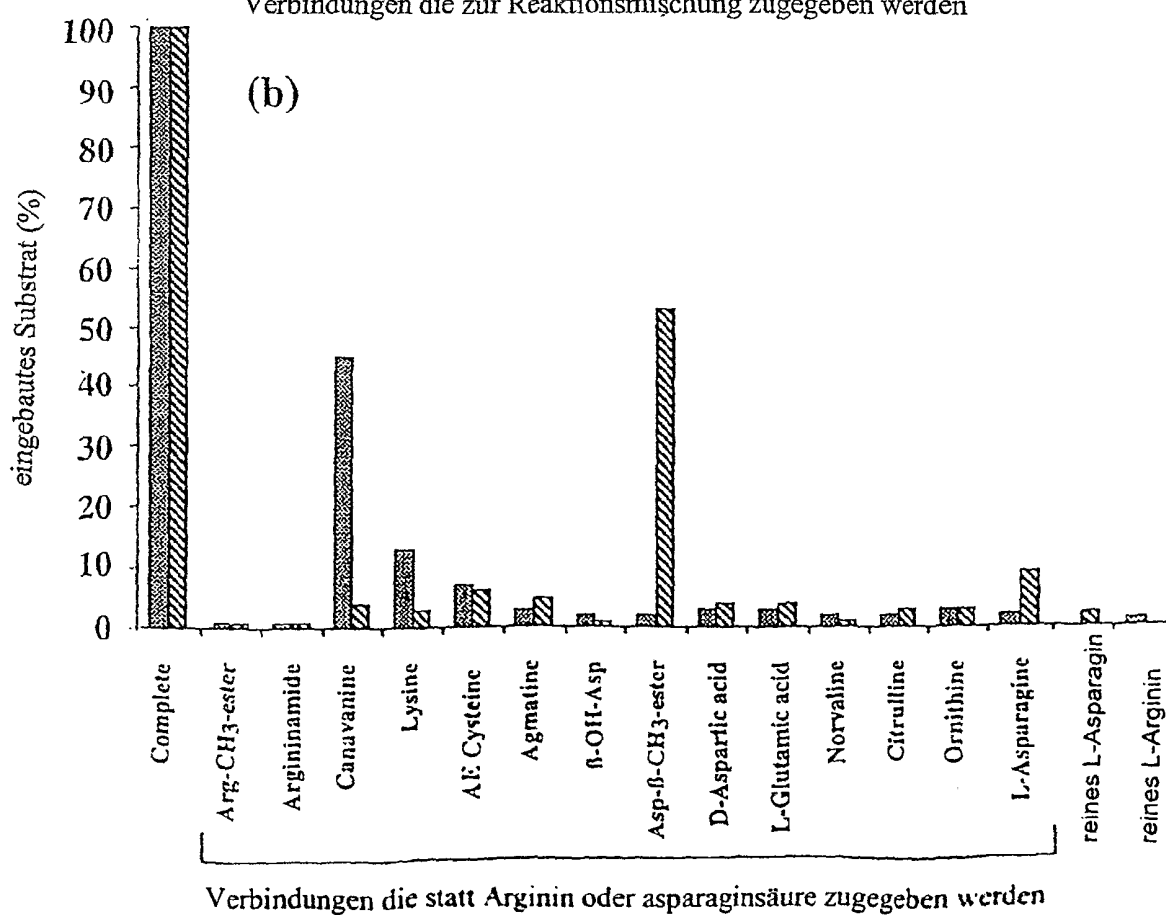
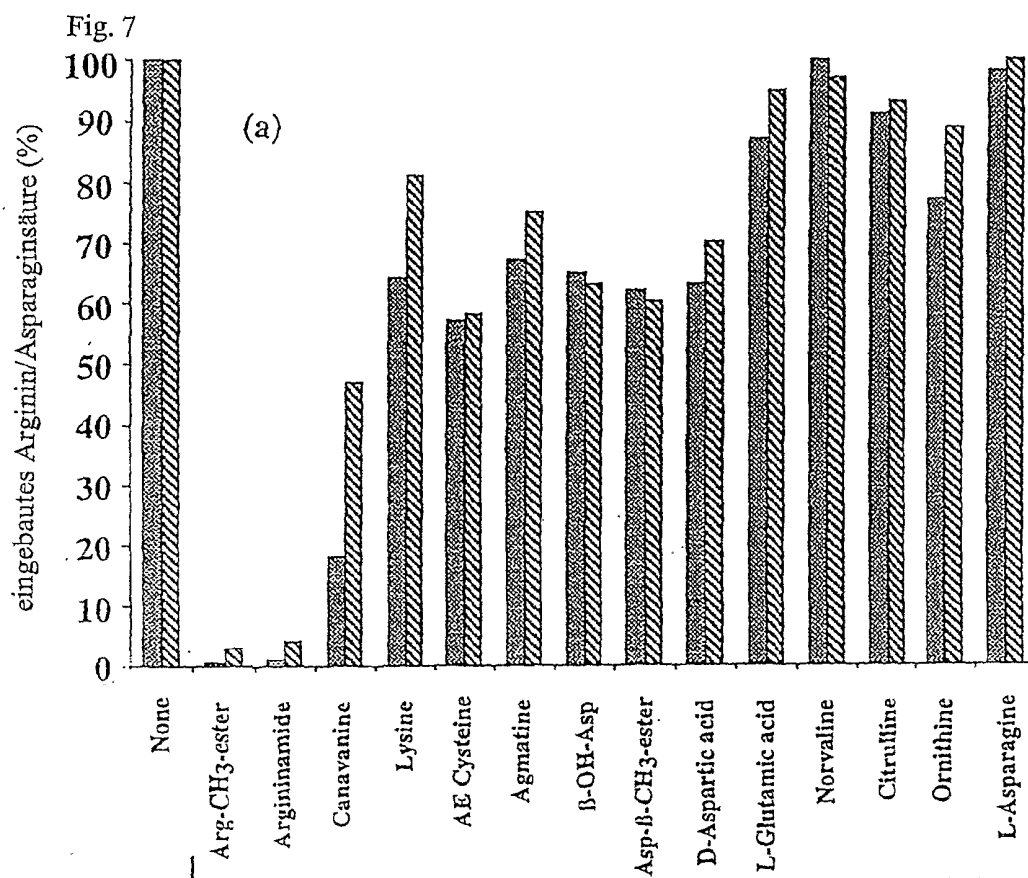


- 6/7 -

Fig. 6



- 7/7 -



- 1 -

SEQUENZPROTOKOLL 1

Sequenzprotokoll der Aminosäuresequenz der erfindungsgemäßen thermostabilen Cyanophycin-Synthetase abgeleitet von dem entsprechenden Cyanophycinsynthetase-Gen

(Die Abkürzungen der Aminosäuren wurden nach der Standard Ein-Buchstaben Methode festgelegt.)

MKILKTQTLRGPNYWSIRROKLIQMRLDLEDVAEKPSNLIPGFYEGLVKILTFLFSRTFLFRDHRGGFL
ERVQEGTYMGHIVEHIALELQELAGMPVGFGRTRETSTPGIYNVVFYVYEEAGRYAGRVAVRLCNSI
ITTGAYGLDELAQDLSDLKDLRANSALGPSTETIIKEAEARQIPWMLLSARAMVQLGYGANQQRIQAT
LSNKTGILGVELACDKEGKTTLAEAGIPVPRGTVIYYADELADAIADVGGYPVILKPLDGNHGRGIT
IDINSQQEAEAYDLASAASKTRSVIVERYKGNDRVLVINGKLVAVSERIPAHVTGNGSSTIEELI
QETNEHPDRGDGHDNVLTRISIDRTSLGVLRQGFEMDTVLKKGEVAYLRATANLSTGGIAIDRTDEI
HPQNIWIAERVAKIIGLDIAGIDVVTDPDITKPLTEVDGVIVEVNAAPGFRMHVAPSQGLPRNVAAPVI
DMLF
PDNHPSRIPILAVTGTNGKTTTTTRLLAHYRQTGKVVGTYTSTDGIYLGDMVEKGDNTGPVSAGVILR
DPTVEVAVLEÇARGGILRSGLAFESCDVGVVLNVAEDHLGLGDIDTIEQMAKVKGVIASVNAADGYAV
LNADDPLVAQMAKNVKGKIAYFSMSKDNPIIIDHLRRNGMAAVYENGYSIFEGEWTLRIEKAENIPV
TMKAMAPFMIANALAASLAAFVHGIDIELIRQGVRSFNPGANQTPGRMNLFDMKDFSVLIDYAHNPAG
YLAVGSFVKNWKGDRLGVIIGPGDRRDEDLMLLGKIASQIFDHIIKEDDDNRGRDRGTVADLIAKGI
VAENPNASYDDILDETEALETGLKKVDKGLLVIFPESVTGSIEMIEKYHLSSE

SEQUENZPROTOKOLL 2

Nucleotidsequenz des *cphA* Gens von *Synechocystis* sp. PCC 6308

ATGAAAATCCTCAAAACACAAACCCTACGGGGACCTAACTATTGGAGTATCCGTCGCCAAAAATTAAT
CCAAATGCGTCTGGATTTAGAAGACGTAGCCGAAAAACCTTCTAACCTGATACCGGGGTTTTATGAAG
GCTTAGTGAAAATATTAACCCTCTTTAGTAGAACATTTCTGTTTACAGAGATCATCGAGGAGGCTTCCTA
GAGAGAGTACAAGAAGGTACTTATATGGGGCATATCGTTGAGCACATGCCCCTAGAATTGCAAGAATT
AGCAGGAATGCCTGTAGGTTTTTGGGCGTACCAGAGAAACTTCAACTCCGGGTATTTATAACGTAGTTT
TTGAGTATGTTTTATGAGGAGGCTGGAAGATACGCAGGTAGAGTCGCCGTCAGACTTTGTAACCTCTATC
ATTACTACAGGGGCTTATGGGCTAGACGAATTAGCTCAAGATTTATCTGATCTCAAGGATTTACGAGC
CAATTCTGCTTTAGGTCTTTCCACCGAACTATTATCAAAGAAGCCGAAGCGAGACAAATTCCTTGGA
TGTTGCTTAGTGCAAGGGCAATGGTACAGTTAGGTTATGGGGCAAATCAACAACGGATTCAAGCAACT
CTGAGTAATAAAACGGGCATCTTAGGGGTGGAGTTAGCTTGTGATAAAGAAGGCACTAAAACCACTTT
AGCGGAAGCTGGTATTCTGTGCCTAGGGGGACTGTTATTTACTATGCTGATGAATTAGCTGATGCCA
TCGCTGATGTGCGTGGTTATCCCATTTGTTCTCAAACCCTTAGACGGCAATCATGGTAGAGGCATTACC
ATTGATATTAACCTCTCAACAGGAAGCTGAGGAGGCTTATGATTTGGCTAGTGCCGCTTCTAAAACCTCG
ATCAGTCATTGTGGAAAGATACTATAAAGGTAATGATCATCGGGTTTTAGTCATCAATGGTAAACTGG
TGGCAGTCTCCGAGAGAATCCCCGCCCACGTACGGGGCAATGGTTCTTCTACCATTGAGGAATTGATT
CAAGAAAACCAATGAACATCCCGATCGAGGTGACGGTCATGATAATGTCTTAAC TAGAATCAGTATCGA
TCGAACCTCCTTAGGAGTCTTAAAAAGACAAGGTTTTCGAGATGGATAACCGTTCTCAAAAAAGGAGAAG
TTGCCTATTTACGAGCTACGGCTAACCTTAGTACCGGGGTATTGCCATCGATCGAACCGATGAAATA
CATCCTCAAAATATTTGGATAGCCGAAAGAGTCGCCAAAATTATTGGTTTAGACATTGCTGGAATTGA
CGTAGTTACCCCGACACATTACCAAACCCTTAACAGAAGTCGATGGGGTAATTGTGGAAGTCAACGCTG
CCCCCGGCTTTAGGATGCACGTGGCCCCCAGTCAAGGCTTACCCCGTAACGTAGCCGCTCCCGTCATC
GATATGTTATTCCCTGATAATCACCCCTAGTCGCATCCCCATTTTAGCGGTGACAGGCACAAACGGGAA
AACCACCACGACTAGACTATTAGCCCATATCTATCGTCAAACGGGGGAAAGTTGTGGGTTATACAGTA
CTGACGGTATTTACTTAGGTGATTACATGGTAGAAAAAGGCGATAACACTGGTCTCTGTGAGCGCTGGA
GTGATTTTGAGAGACCCACCGTAGAAGTTGCCGTGTTAGAGTGTGCTAGAGGGGGAATTTTACGATC
GGGTTTAGCCTTTGAAAGCTGTGATGTTGGCGTTGTCTTAAACGTAGCCGAAGATCATCTAGGATTGG
GAGACATAGACACCATCGAACAAATGGCAAAAGTAAAAGGAGTCATCGCCGAATCAGTCAATGCCGAT
GGTTATGCAGTCCTGAATGCAGACGATCCTTTAGTAGCACAAATGGCGAAAAATGTCAAGGGTAAAT
TGCTTATTTTTCCATGAGTAAAGATAATCCCATCATTATCGATCATTACGGCGTAATGGTATGGCGG
CGGTGTATGAAAACGGCTATCTTTCCATTTTTGAAGGAGAATGGACATTAAGAATTGAGAAAGCGGAA
AATATCCCTGTTACCATGAAAGCCATGGCGCCTTTTATGATTGCCAATGCTTTAGCCGCATCCTTAGC
CGCCTTTGTTACGGTATCGACATCGAATTAATTCGTCAAGGGGTACGCAGTTTTAACCTGGGGCGA
ATCAAAC'CCCCGGCAGAATGAACCTTTTTGACATGAAAGATTTTTCTGTGTGATCGATTACGCCCAT
AATCCTGCGGGTTATTTAGCCGTAGGGAGTTTTGTGAAAAATTGGAAGGGCGATCGCCTTGGAGTAAT
CGGAGGACCGGGTGACAGACGGGATGAGGATTTGATGCTTTTAGGTAAAAATGCCTCTCAAATTTTTG
ATCACATTATCATCAAAGAAGATGACGATAATCGAGGGCGCGATCGAGGTACTGTAGCTGATTTGATA
GCTAAAGGTATTGTGGCTGAAAATCCTAACGCTAGTTATGATGACATCCTCGATGAAACCGAAGCCAT
TGAAACTGGACTCAAAAAGTCGATAAAGGTGGTTTAGTAGTTATTTCCCTGAAAGTGTTACAGGTT
CGATCGAGATGATTGAGAAATATCATCTCAGTAGTGAATAG

SEQUENZPROTOKOLL 3

Sequenzprotokoll der Aminosäuresequenz der erfindungsgemäßen thermostabilen Cyanophycin-Synthetase (SEQ ID NO 4) abgeleitet von dem entsprechenden Cyanophycin-Synthetase-Gen

MRILKIQTLRGPNYWSIRRHKLIVMRDLLENLAETPSNEIPGFYEGLVEALPSLESHYCSPG
CRGGFLKRVREGTMMGHIVEHVALELQELAGMHVGFGRTRQTSTPSVYQVVFEYQNEEAGRY
AGRAAVRLCQSIVDRGRYHKARAEQDLQDLKDLWRDAALGPSTESIVKEAEKRGIPWMQLGA
RFLIQLGYGVNQKRIQATMTDQTGILGVELACDKEATKRILANAGIPVPKGTVINFLDDLEE
AIEYVGGYPPIVIKPLDGNHGRGITINIQNWEEAEAAYDAARQISRSIIVERYYYQGRDHRVLV
VDASSAVAERVPAHVVGDRSTIAELIETNKDPNRGEGHDNLTKEILDRTSYQLLERQGY
TLDSILPQGEICYLRATANLSTGGIAVDRTDEIHPENVWLAQGVVKIVGLDIAGIDIVTPDI
SRPLREVDGVVVEVNAAAPGFRMHVAPSQGTPRNVAAVLDMLFPSEQSSRIPILSIIGTNGK
TTTTRLLAHIFKQTGKVVGYYTTTDGTYIGDFLVEAGDNTGPPSAQLILQDPTVEVAVLETAR
GGILRSGLAFHAANVGVLNVAADHLGIGDIDTIDQLAHLKSVVAEAVFPDGYAILNADDPR
VAAMAERTKANVGYFTMNPDSSELVRNHIQKGGVAAVYENGFLSILKGDWTHRIEKAENIPLT
MGGRAPFMIANALAASLAAFVQNVSIEQIRAGLSTFRASFSQTPGRMNLFNLSFHALVDYA
HNPHSYEALGCFVRSWTNGKRIGVVGPGDRRDQDFITLGKLAAEIFDYAIVKEDDDTRGRT
RGSAADLIIRGIKQVNPYKYESILDETQAINKALDIAPENSLVVILPESVSRAIQLIKARG
VVKEEITQQNSASTTTDSQVGATSSNVNTVNTIL

SEQUENZPROTOKOLL 4

Nucleotidsequenz des *cphA* Gens von *Synechococcus* sp MA19

ATGAGAATCCTCA
AGATCCAGACCTTACGCGGCCCACTACTGGAGCATTGACGCCACAAG
TTGATTGTTATGCGCCTCGATCTAGAAAACCTTGCCGAGACGCCTTCGAA
CGAAATTCCTGGCTTTTATGAAGGATTAGTTGAGGCTCTGCCTAGTCTGG
AGAGTCACTACTGCTCGCCTGGCTGTCGTGGTGGTTTTTTAAAGCGCGTG
CGCGAAGGCACCATGATGGGTCAATTTGTGGAACATGTAGCTCTAGAACT
GCAAGAGTTAGCAGGCATGCACGTGGTTTTTGGCCGCACTCGTCAAACCT
CCACACCCAGTGTGTATCAGGTGGTGTTCGAGTATCAAAACGAGGAAGCA
GGACGCTATGCTGGTAGAGCCGCGTGGCACTGTGTCAAAGTATCGTCTGA
TCGGGGTCGTTATCACAAGCACGAGCTGAGCAAGACTTACAAGATCTCA
AAGACCTGTGGCGCGATGCAGCTTTGGGTCCTTCTACAGAATCGATCGTC
AAAGAAGCTGAAAAAAGAGGTATTCCCTGGATGCAGCTAGGGGCGCGCTT
TTTGATCCAGCTAGGTTACGGCGTCAACCAAAGCGAATTCAAGCTACTA
TGACCGATCAAACCGGCATTTTAGGGGTAGAAGTGGCATGCGATAAAGAA
GCTACAAAGCGCATCCTGGCCAATGCTGGTATACCGGTTCCCAAAGGAAC
GGTAATTAACTTTTTAGATGACTTGGAAGAAGCAATAGAATACGTAGGTG
GCTATCCTATCGTGATCAAACCCCTAGATGGCAATCACGGAAGGGGTATC
ACCATTAACATCCAAAACCTGGGAAGAAGCAGAAGCAGCTTACGACGCT
GCCAGACAAATTTCTCGCTCGATTATTGTAGAACGCTATTATCAGGGACGCG
ATCATCGAGTACTGGTTGTGACGCAAGTAGTGCGGTTGCAGAACGCG
TACCCGCTCATGTGGTTGGAGATGGCAGATCTACTATTGCGGAGCTAATA
GAGGAAACCAACAAAGACCCCAATCGCGGTGAAGGTCACGATAACATCCT
GACCAAATTTGAACTGGACCGTACCAGCTATCAACTATTAGAAAGACAAG
GTTACACATTAGATAGCATCCTTCCTCAGGGTGAAATTTGCTACCTGCGG
GCAACGGCGAATTTAAGTACCGGAGGCATTGCCGTAGACCGTACAGATGAA
ATTACCCCGAAAACGTTTGGCTGGCGCAGGGAGTTGTCAAATTTGTGCG
TTTGGATATTGCCGGAATTGATATTGTTACCCCGGATATCAGTCGTCTCTT
TGCGAGAAGTTGACGGTGTAGTAGTTGAAGTCAACGCCGCTCCCGGGTTC
CGGATGCATGTTGCTCCAGTCAAGGCACCCCCGCAATGTTGCCGCCGC
TGTGCTCGATATGCTGTTCCTCCAGCGAACAATCCAGCCGCATTCCGATT
TTATCCATTATAGGTACCAACGGCAAAACAACCTACCACTCGCTTACTGGCA
CACATTTTTTAAACAAACGGGTAAAGTAGTAGGTTATACAACAACAGACGG
GACTTATATCGGAGATTTCTTGGTAGAAGCAGGAGACAACACCGGTCCCC
AAAGTGCTCAGTTAATCTTGCAAGACCCAACGGTAGAAGTCGCTGTTTTA
GAAACAGCTCGAGGCGGTATTCTTCGTTCCGGATTAGCCTTTTCATGCTGC
CAATGTGGGTGTAGTATTAAATGTAGCCGCAGATCACTTAGGAATCGGCG
ATATCGATAACCATCGACCAGCTGGCTCACCTCAAAGTGTTGGTAGCCGAA
GCTGTTTTTCTGACGGTTACGCTATTCTCAACGCCGACGATCCACGGG
TGGCGGCAATGGCAGAGAGAACTAAAGCCAATGTAGGCTACTTTACCATG
AATCCGGATTTCGAGTTGGTGGCAACCACATTCAAAGGGAGGTGTGGC
GGCGGTATACGAAAACGGCTTTTTATCCATTCTCAAGGGAGACTGGACGC
ACCGAATTGAAAAGGCTGAAAATATTCCCTTGACCATGGGCGGACGCGCA
CCATTTATGATTGCTAACGCTTTAGCAGCTTCTTTGGCGGCGTTGTACAA
AACGTTTCTATAGAACAAATTCGTGCTGGGTTGAGTACGTTTCGCGCTTC
TTTTAGTCAGACACCGGGACGGATGAATTTATTTAATTTAGGTAGTTTCC
ACGCCTTGGTGGATTACGCCCCAATCCTCACAGCTATGAAGCGTTGGGT
TGTTTTGTCCGCAGCTGGACGAACGGAAAGCGTATTGGCGTCGTAGGTGG
ACCTGGCGATCGCCGCGACCAAGACTTTATTACCTTAGGAAAACCTAGCAG
CAGAGATTTTTGACTACGCAATTGTTAAAGAAGACGATGACACTCGAGGA

CGTACCCGCGGTTTCGGCTGCTGATTTAATTATTCGCGGTATTAAACAAGT
AAACCCAAAATATAAATACGAATCGATTTTAGACGAAACACAAGCGATTA
ATAAAGCTTTGGATATTGCCCCGGAAAACAGTCTGGTGGTGATTTTGCCA
GAAAGCGTCAGCCGTGCCATCCAATTAATTAAGGCACGCGGCGTAGTAAAA
GAAGAGATAACTCAACAAAATAGCGCCTCTACCACCACAGATTCCCAAGT
CGGAGCGACTTCTTCGAATGTGGTCAATACGGTGAACACTATATTATGA