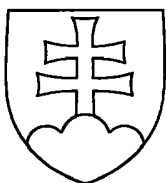


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA**

- (22) Dátum podania prihlášky: **13. 10. 2000**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **199 50 409.1**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **20. 10. 1999**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **DE**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **3. 12. 2001**
Vestník ÚPV SR č.: **12/2001**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT:
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT:

(11), (21) Číslo dokumentu:

1529-2000

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :

**C12N 15/60,
C12N 15/53,
C12N 9/88,
C12N 1/21,
C12P 13/08,
C12P 13/04
/(C12R 1:15)**

(71) Prihlasovateľ: **Degussa-Hüls Aktiengesellschaft, Frankfurt am Main, DE;
Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich, DE;**

(72) Pôvodca: **Eikmanns Bernhard, prof. Dr., Ulm, DE;
Riedel Christian, Neu-Ulm, DE;
Sahm Hermann, prof., Jülich, DE;
Möckel Bettina, Dr., Düsseldorf, DE;**

(74) Zástupca: **Bušová Eva, JUDr., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Nukleotidové sekvencie kódujúce gén pck a spôsoby fermentačnej výroby L-aminokyselín**

(57) Anotácia:
Opísaný je polynukleotid izolovaný z koryneformných baktérií, ktorý obsahuje polynukleotidovú sekvenciu vybranú zo skupiny tvorenej: a) polynukleotidmi, ktoré sú aspoň na 70 % identické s polynukleotidom kódujúcim peptid, ktorého aminokyselinová sekvencia je uvedená v sekvencii id. č. 2, b) polynukleotidmi, ktoré sú aspoň na 70 % identické s polynukleotidom kódujúcim uvedený polypeptid, nachádzajúcim sa v plazmide pEK-pckA, respektíve na plazmide pEK-pckB, c) polynukleotidom kódujúcim peptid, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu, ktorá je aspoň na 70 % identická so sekvenciou aminokyselín podľa sekvencie id. č. 2, d) polynukleotidom komplementárnym k polynukleotidu podľa a), b) alebo c), e) polynukleotidom obsahujúcim aspoň 15 za sebou idúcich báz z polynukleotidovej sekvencie podľa bodov a), b) alebo c).

01-2502-00-Če

Nukleotidové sekvencie kódujúce gén pck a spôsoby fermentačnej výroby L-aminokyselín

Oblasť techniky

Vynález opisuje nukleotidové sekvencie kódujúce gén pck z koryneformných baktérií. Ďalej vynález opisuje spôsob fermentačnej výroby L-aminokyselín, najmä L-lyzínu a L-treonínu tým, že sa zníži expresia produktu génu pck.

Doterajší stav techniky

L-Aminokyseliny, najmä L-lyzín a L-treonín, sú významnými surovinami, ktoré nachádzajú uplatnenie vo výžive ľudí i zvierat, ako i v humánnej medicíne a farmaceutickom priemysle.

Je známe, že tieto aminokyseliny môžu byť vyrobené fermentáciou vhodných kmeňov koryneformných baktérií, najmä *Corynebacterium glutamicum*. Na zlepšenie spôsobu výroby sa sústavne pracuje vďaka významu, ktorý tieto aminokyseliny majú.

Zlepšenie spôsobu výroby týchto aminokyselín sa môže dosiahnuť prostredníctvom zmeny techniky fermentácie, ako napríklad zmenou miešania a prevzdušňovania kyslíkom alebo zmenou zloženia živného média, ako napríklad zmenou koncentrácie cukru v priebehu fermentácie alebo zmenou spôsobu spracovania na výslednú formu, napríklad pridaním čistenia pomocou chromatografie na ionexe alebo zmenou produkčných vlastností samotného fermentujúceho mikroorganizmu.

Na zlepšenie výkonnosti produkčných mikroorganizmov sa použili spôsoby mutagenézy, selekcie a vyhľadávania mutantných

klonov. Týmto spôsobom sa získali kmene, ktoré sú odolné proti antimetabolitom alebo sú auxotrofné vzhľadom na regulačne dôležité aminokyseliny a produkujú požadované L-aminokyseliny.

Už niekoľko rokov sa používajú na zlepšenie kmeňov *Corynebacterium* sp. produkujúcich L-aminokyseliny aj spôsoby rekombinantnej DNA.

Vynález opisuje nové spôsoby fermentačnej výroby aminokyselín.

Podstata vynálezu

Aminokyseliny, najmä L-lyzín a L-treonín, predstavujú komerčne významný produkt s využitím v ľudskej a zvieracej výžive, ako i vo farmaceutickom priemysle a v medicíne. Z toho vyplýva všeobecný záujem o zlepšený spôsob výroby kyseliny pantoténovej.

I. Predmetom vynálezu je polynukleotid izolovaný z koryneformných baktérií, ktorý obsahuje polynukleotidovú sekvenciu, vybranú zo skupiny tvorenej:

- a) polynukleotidmi, ktoré sú aspoň na 70 % identické s polynukleotidom kódujúcim peptid, ktorého aminokyselinová sekvencia je uvedená v sekvencii id. č. 2,
- b) polynukleotidmi, ktoré sú aspoň na 70 % identické s polynukleotidom kódujúcim uvedený polypeptid a nachádzajúcim sa v plazmide pEK-pckA (viď obrázok 1) respektíve na plazmide pEK-pckB (viď obrázok 2),
- c) polynukleotid, kódujúci peptid, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu, ktorá je aspoň na 70 % identická so sekvenciou aminokyselín podľa sekvencie id.č.: 2,

- d) polynukleotid, komplementárny k polynukleotidu podľa a), b) alebo c)
- e) polynukleotid, obsahujúci aspoň 15 za sebou idúcich báz z polynukleotidovej sekvencie podľa bodov a), b) alebo c).

Predmetom vynález je ďalej DNA replikovateľná v koryneformných mikroorganizmoch, vo výhodnom uskutočnení ide o rekombinantnú DNA pochádzajúcu z baktérii *Corynebacterium*, ktorá obsahuje aspoň nukleotidovú sekvenciu, ktorá kóduje gén pck podľa sekvencie id. č. 1.

II. Ďalej vynález popisuje replikovateľnú DNA podľa bodu I. obsahujúcu:

- (i) nukleotidovú sekvenciu podľa sekvencie id.č.: 1, alebo
- (ii) aspoň jednu sekvenciu, ktorá zodpovedá sekvencii podľa bodu (i) vzhľadom na degeneráciu genetického kódu alebo
- (iii) aspoň jednu sekvenciu, ktorá hybridizuje so sekvenciou podľa bodu (i) alebo (ii) alebo s komplementárnymi sekvenciami, a poprípade
- (iv) funkčne neutrálne mutácie v sekvencii podľa bodu (i).

Vynález ďalej opisuje

- polynukleotid podľa bodu II., obsahujúci nukleotidovú sekvenciu zodpovedajúcu sekvencii id.č.: 1,
- polynukleotid podľa bodu II., kódujúci polypeptid, ktorého aminokyselinová sekvencia obsahuje sekvenciu id.č.: 2.

- vektor, obsahujúci polynukleotid podľa bodu I., výhodne vektor pEK-pckA alebo pEK-pckB, vid' obrázok 1 a 2
- hostiteľské bunky koryneformných baktérií obsahujúce deléciu Δpck .

Predmetom vynálezu sú aj polynukleotidy, ktoré podstatným spôsobom pozostávajú zo sekvencie, ktorú možno získať pomocou hybridizačného skríningu zodpovedajúcej knižnice obsahujúcej úplný gén so sekvenciou podľa sekvencie id.č 1, použitím hybridizačnej sondy, ktorá má sekvenciu podľa sekvencie id.č.: 1 alebo aspoň jej fragment, ako i izolácia uvedenej sekvencie DNA z knižnice.

Polynukleotidové sekvencie podľa vynálezu sú vhodné ako hybridizačné sondy pre RNA, cDNA a DNA, v prípade cDNA na izoláciu sekvencie s úplnou dĺžkou (full-length) kódujúcej fosfoenolpyruvátkarboxykinázu (PEP-karboxykinázu) a na izoláciu takých cDNA alebo génov, ktoré vykazujú vysokú sekvenčnú homológiu s génom pre fosfoenolpyruvátkarboxykinázu.

Polynukleotidové sekvencie podľa vynálezu sú ďalej vhodné ako priméry na prípravu DNA z génov kódujúcich fosfoenolpyruvátkarboxykinázu pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR).

Oligonukleotidy slúžiace ako sondy alebo priméry obsahujú aspoň 30, vo výhodnom uskutočnení aspoň 20, v úplne obzvlášť výhodnom uskutočnení aspoň 15 za sebou idúcich báz. Vhodné sú aj oligonukleotidy s dĺžkou aspoň 40 alebo 50 báz.

V ďalšom texte sa pod nasledujúcimi termínmi rozumie:

"Izolovaný" znamená oddelený od svojho prirodzeného pozadia, respektíve okolia.

"Polynukleotid" sa vzťahuje všeobecne na polyribonukleotidy a polydeoxyribonukleotidy, pričom sa môže jednať o nemodifikovanú RNA alebo DNA alebo modifikovanú RNA alebo DNA.

Pod pojmom "polypeptid" se rozumie peptid alebo proteín, ktorý obsahuje dve alebo viac aminokyselín viazaných peptidovými väzbami.

Polypeptidy podľa vynálezu zahŕňajú polypeptid podľa sekvencie id. č.: 2, a ďalej polypeptidy s biologickou aktivitou PEP-karboxykinázy a aj také, ktoré sú aspoň na 70 % identické s polypeptidom podľa sekvencie id.č.: 2, vo výhodnom uskutočnení aspoň na 80 % identické a v obzvlášť výhodnom uskutočnení aspoň na 90 % až 95 % identické s polypeptidom podľa sekvencie id.č.: 2 a ktoré vykazujú uvedenú aktivitu.

Predmetom vynálezu je ďalej spôsob výroby aminokyselín, najmä L-lyzínu a L-treonínu, použitím koryneformných baktérií, najmä takých, ktoré požadované aminokyseliny už produkujú, a v ktorých zoslabený gén *pck*, najmä tým, že je znížená jeho expresia.

Pod pojmom "zoslabenie" sa v tomto prípade rozumie zníženie alebo úplné zastavenie intracelulárnej aktivity jedného alebo niekoľkých enzýmov (proteínov) v mikroorganizme, ktoré sú kódované príslušnými DNA, napríklad tým, že sa použije slabý promótor, alebo sa použije gén, popřípade alela, ktorá kóduje príslušný enzým s nižšou aktivitou, alebo sa príslušný enzým (proteín) inaktivuje a popřípade kombinácia týchto účinkov.

Mikroorganizmy podľa vynálezu môžu vytvárať L-aminokyseliny, najmä L-lyzín a L-treonín, z glukózy, sacharózy, laktózy, fruktózy, maltózy, melasy, škrobu, celulózy alebo z glycerolu a etanolu. Môže sa jednať o zástupcov koryneformných baktérií najmä z rodu *Corynebacterium*. Z rodu *Corynebacterium* treba uviesť predovšetkým druh *Corynebacterium glutamicum*, ktorý je

odborníkom známy pre svoju schopnosť produkovať L-amino-kyseliny.

Vhodnými kmeňmi baktérií rodu *Corynebacterium*, najmä druhu *Corynebacterium glutamicum*, sú napríklad tieto prirodzene sa vyskytujúce kmene:

- Corynebacterium glutamicum* ATCC13032
- Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806
- Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870
- Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539
- Corynebacterium melassecola* ATCC17965
- Brevibacterium flavum* ATCC14067
- Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 a
- Brevibacterium divaricatum* ATCC14020

a od nich odvodené mutantné kmene produkujúce aminokyseliny, ako napríklad

kmene produkujúce L-lyzín

- Corynebacterium glutamicum* FERM-P 1709
- Brevibacterium flavum* FERM-P 1708
- Brevibacterium lactofermentum* FERM-P 1712
- Corynebacterium glutamicum* FERM-P 6463
- Corynebacterium glutamicum* FERM-P 6464 a
- Corynebacterium glutamicum* DSM5714

alebo kmene produkujúce L-treonín

- Corynebacterium glutamicum* ATCC21649
- Brevibacterium flavum* BB69
- Brevibacterium flavum* DSM5399
- Brevibacterium lactofermentum* FERM-BP 269
- Brevibacterium lactofermentum* TBB-10
- Corynebacterium glutamicum* MH20-22B-DR17

Autorom vynálezu sa podarilo izolovať nový gén z baktérie *C. glutamicum*, ktorý kóduje fosfoenolpyruvátkarboxykinázu (EC 4.1.1.49) - gén *pck*.

Na izoláciu tohto génu *pck* respektíve na izoláciu ľubovoľného iného génu z baktérií *C. glutamicum* treba najprv vytvoriť génovú knižnicu tohto mikroorganizmu v baktériách *E. coli*. Vytvorenie takej knižnice je opísané vo všeobecne známych učebniciach a príručkách. Ako príklad možno uviesť učebnicu Winnacker: Gény a klony: Úvod do genetických technológií (nakladateľstvo Chemie, Weinheim, Nemecko, 1990) alebo príručku Sambrook a ďalší Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Príkladom jednej veľmi známej knižnice je *E. coli* K-12 kmeňa W3110 v λ -vektoroch vytvorená a opísaná Koharom a ďalšími (vid' Cell 50, strana 495 až 508 (1987)). Bathe a ďalší opisujú (vid' Molecular and General Genetics, 252: strana 255 až 265, 1996) DNA knižnicu baktérie *C. glutamicum* ATCC13032, vytvorenú pomocou kozmidu SuperCos I (Wahl a ďalší 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84: strana 2160 až 2164) v baktériách *E. coli* K-12 kmeňa NM554 (vid' Raleigh a ďalší 1988, Nucleic Acids Research 16: strana 1563 až 1575). Börmann a ďalší. (Molecular Microbiology 6(3), strana 317 až 326) ďalej opisujú knižnicu baktérií *C. glutamicum* ATCC13032 vytvorenú použitím kozmidu pHC79 (Hohn a Collins, Gene 11, strana 291 až 298 (1980)).

Na prípravu DNA knižnice baktérie *C. glutamicum* v *E. coli* sa môžu použiť aj plazmidy, ako napríklad pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, strana 807 až 818 (1979)) alebo pUC9 (Norrande a ďalší 1983, Gene 26: strana 101 až 106). Ako hostiteľské sú vhodné najmä také kmene *E. coli*, ktoré sú reštrikčne a rekombinačne deficientné.

Táto DNA knižnica sa potom preniesie do indikátorového kmeňa, či už pomocou transformácie (viz Hanahan, Journal of Molecular

Biology 166, strana 557 až 580, 1983) alebo elektroporácie (Tauch a ďalší, 1994, FEMS Microbiological Letters, 123: strana 343 až 347). Vhodný indikátorový kmeň sa vyznačuje tým, že obsahuje mutáciu vo vhodnom géne, a to takú, ktorá vyvoláva viditeľnú zmenu fenotypu, napríklad závislosť od prídavku metabolitu do kultivačného média (auxotrofiu).

Pre oblasť tohto vynálezu je významný mutantný kmeň baktérii *E. coli* HG4 opísaný Goldie a Sanwalom (Journal of Bacteriology 141: strana 1115 až 1121 (1980)). Tento kmeň nesie mutáciu v géne *pck*, ktorá výrazne obmedzuje rast týchto baktérií na médiu so sukcinátom ako výhradným zdrojom uhlíka. Po transformácii vektorom, ktorý nesie gén *pck* môže dôjsť k obnoveniu rastu na médiu so sukcinátom ako výhradným zdrojom uhlíka.

Dlhé fragmenty DNA klonované pomocou kozmidov alebo iných vektorov môžu byť následne použité na subklonovanie kratších fragmentov do známych vektorov. Tým sa umožní bližšie určenie génu podľa vynálezu k jednej špecifickej sekvencii DNA.

Na to možno použiť plazmidové vektory známe zo stavu techniky, ako napríklad pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, strana 807 až 818 (1979)) alebo vektory série pSU (Bartolomé a ďalší (Gene 102, strana 75 až 78 (1991))). Je výhodné použiť kyvadlový vektor, ktorý sa replikuje v baktériách *Escherichia coli* aj v baktériách *Corynebacterium glutamicum*, ako napríklad vektor pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: strana 549 až 554) alebo vektor pEK0 (Eikmanns a ďalší, Gene 102 (1991)). Ak sa použije taký kyvadlový vektor, potom možno uskutočňovať skrining v oboch druhoch baktérií. Príkladmi takých vektorov sú plazmidy pEK-pckA (obrázok 1) a pEK-pckB (obrázok 2), ktoré boli skonštruované na základe vektoru pEK0 a nesú gén *pck* podľa vynálezu.

Týmto spôsobom charakterizované fragmenty DNA sa potom subklonujú do vhodného sekvenačného vektora. Popríklad možno do sekvenačného vektora subklonovať priamo fragmenty dlhého úseku DNA z pôvodného kozmidu. Príkladmi takýchto vektorov vhodných na sekvenovanie DNA sú plazmidy pGEM-5zf(-) alebo pGEM-5zf(+) od firmy Promega Corporation (viď Promega Protocols and Application Guide, druhé vydanie 1991, katalógové číslo Y981, Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA).

Spôsoby sekvenovania DNA boli okrem iného opísané Sangerom a ďalšími (Proceedings of the National of Sciences of the United States of America, 74: strana 5463 až 5467, 1977).

Získanú nukleotidovú sekvenciu možno potom spracovať známymi algoritmami, respektíve programami na analýzu sekvencií, ako sú napríklad programy Stadenovho balíka (Nucleic Acids Research 14, strana 217 až 232 (1986)), balík GCG (viď Butler, Methods of Biochemical Analysis 39, strana 74 až 97 (1998)), program FASTA od Pearsona a Lipmana (Proceedings of the National Academy of Sciences USA 85, strana 2444 až 2448 (1988)) alebo program BLAST (Altschul a ďalší, (Nature Genetics 6, strana 119 až 129 (1994)) a porovnať so sekvenciami vo verejne prístupných databázach.

Ako verejne prístupná databáza nukleotidových sekvencií sa môže použiť napríklad databáza Európskeho laboratória pre molekulovú biológiu (EMBL, Heidelberg, Nemecko) alebo on-line služba na servere NCBI ("National Center for Biotechnology Information", Národné centrum pre biotechnologické informácie) Národnej lekárskej knižnice (National Library of Medicine, Bethesda, MD, USA).

Týmto spôsobom sa získala nová sekvencia génu pck z baktérii *C. glutamicum*. Táto sekvencia je ako sekvencia id.č.:1 súčasťou vynálezu. Ďalej bola od tejto sekvencie DNA vyššie opísaným spôsobom odvodená sekvencia aminokyselín

zodpovedajúceho proteínu. Táto sekvencia je uvedená ako sekvencia id.č.: 2.

Kódujúce sekvencie DNA, ktoré v dôsledku degenerácie genetického kódu zodpovedajú sekvencii id.č.:1 sú tiež súčasťou vynálezu. Súčasťou vynálezu sú aj sekvencie DNA, ktoré so sekvenciou id.č.:1 hybridizujú. Napokon sú súčasťou vynálezu sekvencie DNA, ktoré vzniknú polymerázovou reťazovou reakciou (PCR) použitím primérov odvodených zo sekvencie id.č.:1. Také oligonukleotidy majú typicky dĺžku aspoň 15 párov báz.

Návody na identifikáciu DNA pomocou hybridizácie môžu odborníci nájsť napríklad v príručke "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" (Príručka užívateľa systému DIG na hybridizáciu) od firmy Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Nemecko, 1993) a ďalej v článku Liebl a ďalší., (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: strana 255 až 260). Návody na amplifikáciu DNA pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) nájde odborník napríklad v príručke Gait: "Oligonucleotide synthesis: a practical approach" (Syntéza oligonukletidov: praktický prístup, IRL Press, Oxford, Spojené kráľovstvo 1984) a v knihe Newton a Graham: PCR (Akademické nakladateľstvo Spektrum, Heidelberg, Nemecko, 1994).

Autori vynálezu odhalili, že koryneformné baktérie po zoslabení génu *pck* produkujú väčšie množstvo L-aminokyselín, najmä L-lyzínu a L-treonínu.

Zoslabenie génu *pck* sa môže docieľiť buď znížením expresie tohto génu alebo tým, že sa zhoršia, poprípade úplne inhibujú katalytické vlastnosti tohto enzýmu. Poprípade možno obidva prístupy kombinovať.

Zníženie génovej expresie možno dosiahnuť pomocou vhodného spôsobu kultivácie alebo pomocou genetickej zmeny (mutácie)

v signálnych oblastiach tohto génu. Signálnymi oblasťami génovej expresie sa mienia napríklad represory, aktivátory, operátory, promótor, atenuátory, väzbové miesta pre ribozómy, štart-kodón a terminátory. Odborník nájde bližšie údaje napríklad v patentovej prihláške WO 96/15246, v publikáciách Boyd a Murphy (Journal of Bacteriology 170: strana 5949 (1988)), Voskuil a Chambliss (Nucleic Acids Research 26: strana 3548 (1998)), Jensen a Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, strana 191 až 195 (1998)), Patek a ďalší., (Microbiology 142: strana 1297 (1996) a v známych učebniciach genetiky a molekulovej biológie, ako napríklad v učebnici Knippers: "Molekulová genetika", 6. vydanie, nakladateľstvo Georg Thieme, Stuttgart, Nemecko, 1995) alebo v učebnici Winnacker: Gene und Klone: Eine Einführung in die Gentechnologie (Gény a Klony: Úvod do génového inžinierstva, nakladateľstvo Chemie, Weinheim, Nemecko, 1990).

Mutácie, ktorý vedú k zmene, respektíve k zníženiu katalytických schopností enzýmu, sú známe zo stavu techniky; ako príklady možno uviesť práce Qiu a Goodmana (Journal of Biological Chemistry 272: strana 8611 až 8617 (1997)), Sugimota a ďalších (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: strana 1760 až 1762 (1997)) a Möckela "Treonindehydratáza z baktérie *Corynebacterium glutamicum*: zrušenie alosterickej regulácie a štruktúra tohto enzýmu" ("Die Threonindehydratase aus *Corynebacterium glutamicum*: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms") uvedené v správe Výskumného centra v Jülichu (Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Nemecko, 1994). Vyčerpávajúce informácie k tejto téme možno ďalej nájsť v známych učebniciach genetiky a molekulovej biológie, ako napríklad v učebnici Hagemann „Všeobecná genetika“ („Allgemeine Genetik“, nakladateľstvo Gustav Fischer, Stuttgart, 1986).

Medzi mutácie, ktoré prichádzajú do úvahy patrí tranzícia, transverzia, inzercia a delécia. V závislosti od účinku zámer.

aminokyselín na enzymatickú aktivitu možno uvažovať o mutáciách s pozmeneným zmyslom (missense) alebo o mutáciách bez zmyslu (nonsense). Inzercia alebo delécia aspoň jedného páru báz v géne vedie k mutácii so zmenou čítacieho rámca (frame shift), čo znamená, že sa do proteínu zabudujú chybné aminokyseliny a alebo sa translácia predčasne ukončí. Delécia niekoľkých kodónov vedie väčšinou k úplnému vymiznutiu enzymatickej aktivity. Návod na vloženie vhodnej mutácie sú známe zo stavu techniky a možno sa o nich dočítať v známych učebniciach genetiky a molekulovej biológie, ako napríklad v učebnici Knippers: "Molekulová genetika", 6. vydanie, nakladateľstvo Georg Thieme, Stuttgart, Nemecko, 1995) alebo v učebnici Winnacker: Gene und Klone: Eine Einführung in die Gentechnologie (Gény a Klony: Úvod do génového inžinierstva, nakladateľstvo Chemie, Weinheim, Nemecko, 1990), alebo v učebnici Hagemann „Všeobecná genetika" („Allgemeine Genetik", nakladateľstvo Gustav Fischer, Stuttgart, 1986).

Príkladom pozmeneného (zmutovaného) génu pck je alela Δ pck obsiahnutá v plazmide pK19mobsacB Δ pck (viď obrázok 3). To Δ pckAllel pozostáva len z 5'- a 3'-medzných oblastí génu pck; v géne chýba (delécia) 1071 bp dlhý fragment kódujúcej oblasti. Δ pck-alela môže byť vložená do koryneformnej baktérie pomocou integračnej mutagenézy. Na to sa použije vyššie uvedený plazmid pK19mobsacB Δ pck, ktorý nie je replikovateľný v baktériách *C. glutamicum*. Po prenose pomocou konjugácie alebo transformácie a po homológnej rekombinácii pomocou najprv jednej integrujúcej "cross over" udalosti a potom pomocou druhej excíznej "cross over" udalosti sa dosiahne to, že sa do daného kmeňa baktérie integruje alela Δ pck miesto pôvodnej alely pck a dôjde tak k totálnej strate funkcie enzýmu.

Návod a vysvetlenia postupov na integračnú mutagenézu nájdete odborník napríklad publikáciách Schwarzer a Pühler (Bio/Technology 9, strana 84 až 87 (1991), alebo Peters-

Wendisch a ďalší. (Microbiology 144, strana 915 až 927 (1998)).

Ako príklad kmeňa koryneformných baktérií s oslabeným génom *pck* produkujúcich aminokyseliny možno uviesť napríklad kmeň MH20-22BΔ*pck* produkujúci lyzín alebo kmeň DM368-2Δ*pck* produkujúci treonín.

Okrem zoslabenia génu *pck* môže byť pre produkciu L-amino-kyselín výhodné ešte zvýšiť expresiu jedného alebo niekoľkých enzýmov príslušnej biosyntetickej dráhy.

Tak napríklad produkciu L-lyzínu možno zvýšiť:

- súčasným zvýšením expresie génu *dapA*, ktorý kóduje dihydrodipikolinátsyntázu (viď EP-B 0 197 10 335), alebo
- súčasnou amplifikáciou fragmentu DNA spôsobujúceho rezistenciu na S-(2-aminoetyl)cysteín (viď EP-A 0 088 166).

Tak napríklad produkciu L-treonínu možno zvýšiť:

- súčasným zvýšením expresie génu *hom*, ktorý kóduje homoserindehydrogenázu (Peoples a ďalší, Molecular Microbiology 2, strana 63 až 72 (1988)) alebo zvýšením expresie alely génu *hom^{dr}*, respektíve *hom_{FBR}*, ktoré kódujú homoserindehydrogénázu odolnú voči spätnoväzbovej regulácii (Archer a ďalší., Gene 107, strana 53 až 59 (1991); Reinscheid a ďalší Journal of Bacteriology 173, strana 3228 až 3230 (1991)).

Okrem zoslabenia génu *pck* môže byť pre produkciu L-amino-kyselín podľa vynálezu, najmä lyzínu a treonínu, ďalej výhodné ešte inhibovať nežiaduce vedľajšie reakcie (viď Nakayama: "Breeding of amino Acid Producing Micro-organisms" (Pestovanie mikroorganizmov produkujúcich aminokyseliny) v knihe: Overproduction of Microbial Products, (Produkcia mikrobiálnych

produktov) editorov Krumphanzla, Sikytu a Vanka, Academic Press, Londýn, Spojené kráľovstvo, 1982.

Mikroorganizmy podľa vynálezu môžu byť na účely produkcie aminokyselín, najmä L-lyzínu a L-treonínu, kultivované kontinuálnym spôsobom alebo spôsobmi diskontinuálnymi, či už vsádzkovou (batch) kultiváciou alebo vsádzkovou kultiváciou s prítokom živín (fed batch) alebo vsádzkovou kultiváciou s opakovaným prídavkom živín (repeated fed batch) prietokovou kultiváciou. Prehľad známych spôsobov kultivácie je uvedený v učebnici Chmiel: Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Úvod do biotechniky, nakladateľstvo Gustav Fischer, Stuttgart, 1991) alebo v učebnici Storhas: Bioreaktoren und Periphere Einrichtungen (Bioreaktory a periférne zariadenia, nakladateľstvo Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994).

Používané kultivačné médium musí patričným spôsobom vyhovovať nárokom príslušného mikroorganizmu. Opisy rôznych známych kultivačných médií pre mikroorganizmy sú uvedené príručke "Manual of Methods for General Bacteriology" (Metodický manuál pre všeobecnú baktériológiu) vydaný Americkou bakteriologickou spoločnosťou (American Society for Bacteriology), Washington D.C., USA, v roku 1981. Ako zdroje uhlíka sa môžu použiť cukry a sacharidy, ako napríklad glukóza, sacharóza, laktóza, fruktóza, maltóza, melasa, škrob a celulóza; oleje a tuky ako napríklad sójový olej, slnečnicový olej, podzemnicový olej a kokosový tuk; mastné kyseliny, ako napríklad kyselina palmitová, kyselina stearová a kyselina linolová, alkoholy, ako napríklad glycerol a etanol, a organické kyseliny, ako napríklad kyselina octová. Tieto látky sa môžu použiť buď jednotlivo, alebo v zmesi. Ako zdroje dusíka sa môžu použiť zlúčeniny obsahujúce organický dusík, ako napríklad peptón, kvasnicový extrakt, mäsový extrakt, sladový extrakt, kukuričný extrakt, sójová múčka a močovina, alebo anorganické zlúčeniny, ako napríklad síran amónny, chlorid amónny,

fosforečnan amónny, uhličitan amónny a dusičnan amónny. Tieto zdroje dusíka sa môžu použiť buď jednotlivo, alebo v zmesi. Ako zdroje fosforu možno použiť hydrogenfosforečnan alebo dihydrogenfosforečnan draselný alebo príslušné sodné soli. Kultivačné médium musí ďalej obsahovať soli kovov, ktoré sú nutné na rast, ako napríklad síran horečnatý alebo síran železnatý. A napokon môže byť kultivačné médium okrem vyššie uvedených látok obohatené o esenciálne rastové látky, ako napríklad aminokyseliny a vitamíny. Na zvýšenie tvorby aminokyselín možno kultivačné médium ešte obohatiť o ich prekursor. Uvedené zložky môžu byť pridané do média jednorazovo na začiatku alebo vhodným spôsobom v priebehu kultivácie.

Na kontrolu pH v priebehu kultivácie sú vhodné zásadité zlúčeniny, ako napríklad hydroxid sodný, hydroxid draselný, amoniak, alebo kyslé zlúčeniny, ako napríklad kyselina fosforečná alebo kyselina sírová. Penenie kultivačnej zmesi možno kontrolovať prídavkom činidiel potláčajúcich tvorbu peny, ako sú napríklad polyglykolestery mastných kyselín. Stabilitu plazmidov možno udržiavať prostredníctvom vhodného selekčného činidla, napríklad antibiotika. Vhodné aeróbne podmienky možno udržiavať privádzaním kyslíka alebo zmesi plynov obsahujúcej kyslík, napríklad vzduchu, do kultivačného média. Vhodná teplota na pestovanie baktérií je zvyčajne pohybuje od 20 °C do 50 °C a výhodne od 25 °C do 45 °C. Čas kultivácie by mal byť taká, aby sa dosiahlo maximum tvorby aminokyselín. Toto maximum sa obvykle dosiahne v priebehu 10 až 160 hodín.

Nasledujúce mikroorganizmy boli uložené v Nemeckej zbierke mikroorganizmov a bunkových kultúr (DSMZ, Braunschweig, SRN, podľa ustanovení Budapeštianskej zmluvy:

- kmeň *Escherichia coli* DH5α/pK19mobsacBΔpck ako DSM 13047

Spôsob podľa vynálezu slúži na fermentačnú produkciu L-aminokyselín, najmä kyseliny L-asparágovej, L-asparagínu, L-homoserínu, L-treonínu, L-izoleucínu a L-metionínu s využitím koryneformných baktérií, a vo výhodnom uskutočnení najmä na fermentačnú produkciu L-lyzínu a L-treonínu.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Vynález bude bližšie opísaný v nasledujúcich príkladoch.

Na tento účel sa uskutočnili okrem iného pokusy s baktériami *Corynebacterium glutamicum* kmeňa MH20-22B produkujúcimi lyzín a s baktériami *Brevibacterium flavum* kmeňa DM368-2 produkujúcimi treonín. Kmeň MH20-22B je uložený v Nemeckej zbierke mikroorganizmov a bunkových kultúr (DSMZ, Braunschweig, SRN) podľa ustanovení Budapeštianskej zmluvy ako DSM5715 (EP-B-0435 132) a kmeň DM368-2 je uložený ako DSM5399 (EP-B-0385 940).

Príklad 1:: Izolácia génu pck

Na izoláciu génu fosfoenolpyruvátkarboxykinázy (PEP) (pck) z baktérie najprve vytvorena kozmidová knižnica *C. glutamicum* založená na kozmide pH79 (Hohn a Collins, Gene 11, strana 291 až 298 (1980)). Knižnica bola vytvorená pomocou známej metodiky (Sambrook a ďalší: Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Laboratórny manuál molekulového klonovania, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Najprv sa izolovala chromozómová DNA baktérie *C. glutamicum* ATCC13032 (Eikmanns a ďalší, Microbiology 140 (1994) strana 1817 až 1828), ktorá bola potom čiastočne naštiepená reštrikčným enzýmom Sau3A. Po ligácii získaných fragmentov do miesta

BamHI kozmidu pHC79 boli tieto fragmenty zabalené do proteínového obalu baktériofága lambda. Fágové častice sa potom použili na transfekciu baktérií *E. coli* kmeňa ED8654 (viď Murray a ďalší, *Molecular and General Genetics* 150 (1997) strana 53 až 61). Balenie rekombinantnej kozmidovej DNA do proteínového obalu fága lambda sa uskutočnilo spôsobom podľa Sternberga a ďalších (*Gene* 1 (1979), strana 255 až 280). Transfekcia baktérií *E. coli* kmeňa ED8654 sa uskutočnila spôsobom podľa Sambrooka a ďalších (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Laboratórny manuál molekulového klonovania, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

Z celkom 30 získaných rekombinantných klonov *E. coli* boli izolované zodpovedajúce kozmidy, viď Sambrook a ďalší (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Tieto kozmidy boli podrobene reštrikčnej analýze enzýmom HindIII. Tato analýza ukázala, že 24 zo skúmaných kozmidov obsahovalo inzert a že približná veľkosť inzertov bola okolo 35 kb. Celkom sa izolovalo 2200 klonov *E. coli* nesúcich kozmid a z tejto knižnice sa známymi spôsobmi (Sambrook a ďalší, *Molecular Cloning, A Laboratory Handbook*, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) izolovala kozmidová DNA.

Gén *pck* baktérie *Corynebacterium glutamicum* sa izoloval tak, že mutantné baktérie *E. coli* HG4 (Goldie and Sanwal, *Journal of Bacteriology* 141 (1980) strana 1115 až 1121), ktoré majú defektnú PEP-karboxykinázu, boli známym spôsobom (Sambrook a ďalší, *Molecular Cloning, A Laboratory Handbook*, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) transformované vyššie opísanou kozmidovou knižnicou. Mutantné baktérie HG4 nie sú vďaka defektu v PEP-karboxykináze schopné rásť na médiu so sukcinátom ako jediným zdrojom uhlíka. Po transformácii uvedenej kozmidovej knižnice do mutantných baktérií boli získaných celkom 1200 klonov. Z týchto klonov boli celkom dva klony schopné rásť na minimálnom médiu M9 (Sambrook a ďalší,

Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) so sukcinátom (0,4%) ako jediným zdrojom uhlíka. Z týchto dvoch klonov bol izolovaný zodpovedajúci kozmid (Sambrook a ďalší, Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) a ten bol opätovnou transformáciou vložený do mutantných baktérií *E. coli* HG4. Baktérie získané touto opätovnou transformáciou boli opäť schopné rásť na médiu M9 so sukcinátom ako jediným zdrojom uhlíka.

Teraz bolo treba nájsť gén *pck* z baktérie *C. glutamicum* v niektorom menšom fragmente pôvodného kozmidu. Na tento účel boli uvedené dva *pck*-komplementujúce kozmidy naštiepené reštrikčnými enzýmami *XhoI*, *ScaI* a *PvuII* a známym spôsobom (Sambrook a ďalší, Molecular Cloning: A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) eletroforeticky rozdelené na 0,8% agarózovom géle. Fragментy s veľkosťou nad 3,0 kb boli izolované z gélu pomocou elektroelúcie (Sambrook a ďalší, Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press). Takto izolované fragmenty boli ligáciou vložené do miesta *SalI* (fragmenty vzniknuté štiepením enzýmom *XhoI*), respektíve do Klenowovým fragmentom *E. coli* polymerázy zatupeného miesta *EcoRI* (fragmenty vzniknuté štiepením enzýmami *ScaI* a *PvuII*) vektora *pEKO* (Eikmanns a ďalší, Gene 102 (1991) strana 93 až 98). Touto ligačnou zmesou boli transformované baktérie *E. coli* kmeňa HG4 a získané transformované klony boli testované na schopnosť rastu na médiu so sukcinátom ako výhradným zdrojom uhlíka. Medzi baktériami získanými po štiepení enzýmom *PvuII* sa objavilo sedem klonov, ktorých plazmidy umožnili mutantom HG4 rásť na médiu so sukcinátom. Z týchto rekombinantných kmeňov boli izolované zodpovedajúce plazmidy a uskutočnilo sa reštrikčné mapovanie. Z tohto mapovania vyplynulo, že všetkých sedem plazmidov obsahuje totožný 4,3 kb dlhý *PvuII* inzert, pričom tento inzert sa v troch klonoch vyskytoval v jednej orientácii a v štyroch v opačnej. Podľa orientácie inzertu vo vektore

boli novo skonštruované plazmidy označené ako pEK-pckA a pEK-pckB. Reštrikčné mapy obidvoch plazmidov - viď obrázky 1 a 2.

Príklad 2: Sekvenovanie štruktúrneho génu pck a príslušných oblastí

Sekvenoval sa približne 3,9 kb dlhý EcoRI fragment z plazmidu pEK-pckA (jedno EcoRI miesto pritom pochádzalo z vektora pEKO), ktorý bol izolovaný známym spôsobom. Presahujúce konce tohoto fragmentu boli zarovnané Klenowovým fragmentom DNA-polymerázy (Sambrook a ďalší, Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) a výsledný fragment bol vložený ligáciou do EcoRV miesta vektora pGEM-5Zf(+) (Promega, Madison, WI, USA). Inzerty v takto vzniknutých plazmidoch boli sekvenované metódou terminácie reťazca (Sanger a ďalší, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 74 (1977) strana 5463 až 5467). Výsledná sekvencia je uvedená ako sekvencia id.č.:1. Získaná nukleotidová sekvencia s dĺžkou 3935 bp bola analyzovaná programovým balíkom HUSAR (verzia 3.0) umiesteným na serveri Nemeckého centra pre výskum rakoviny (DKFZ, Heidelberg, Nemecko). Analýzou sa odhalil jeden otvorený čítací rámec s veľkosťou 1830 bp, kódujúci proteín so 610 aminokyselinami.

Príklad 3: Zvýšená expresia génu pck

Elektroporáciou a následnou selekciou na platniach BHI s kanamycínom (50 µg/ml, viď Liebl a ďalší, FEMS Microbiology Letters 65 (1989), strana 299 až 304) boli plazmidy pEK-pckA a pEK-pckB vložené do baktérií *C. glutamicum* kmeňa ATCC13032 a výsledné kmene boli označené ako ATCC13032/pEK-pckA a ATCC13032/pEK-pckB. Oba tieto kmene, ako

i kmeň východiskový sa previedli do komplexného média Luria-Bertani (Sambrook a ďalší, Molecular Cloning: A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) a uskutočnil sa na nich test na aktivitu PEP-karboxykinázy spôsobom podľa Bentla a Lardyho (Journal of Biological Chemistry 251 (1976), strana 2916 až 2921). Výsledok tejto analýzy je uvedený v tabuľke 1 a vyplýva z neho, že PEP-karboxykinázová aktivita obidvoch kmeňov s plazmidmi pEK-pckA, respektíve pEK-pckB je 10-krát až 12-krát vyššia ako aktivita vo východiskovom kmeni.

Tabuľka 1: PEP-karboxykinázová aktivita v jednotlivých kmeňoch baktérií

Kmeň	PEP-karboxykinázová aktivita (nmol min ⁻¹ na mg proteínu)
ATCC13032	120
ATCC13032/pEK-pckA	1270
ATCC13032/pEK-pckB	1510

Príklad 4: Príprava integračného plazmidu na delečnú mutagenézu pck-génu

Na inaktiváciu génu pre PEP-karboxykinázu bol z vektora pEK-pckB (viď obrázok 2) izolovaný EcoRI-SacI fragment génu pck a tento fragment sa ligáciou vložil do vektora pGEM-7Zf(+)(Promega, Madison, WI, USA). Z výsledného plazmidu bol z génu pck vyštiepený 1,07 kb dlhý fragment HindII-HindIII a potom bol izolovaný gén pck s touto 1,07 kb dlhou deléciou

ako BfrI-SacI. Gén s deléciou bol najprv zatupený a potom vložený ligáciou do vektora pK19mobsacB, ktorý sa replikuje v baktériách *C. glutamicum* (Schäfer a ďalší, (1994) Gene 145, strana 69 až 73). V takto skonštruovanom integračnom plazmide pK19mobsacBΔpck (viď obrázok 3) hraničí 5'-oblasť génu pck (350 bp) priamo s 3'-oblasťou tohto génu (340 bp); v genóme sú normálne obidve tieto oblasti od seba oddelené 1071 bp dlhým fragmentom génu. Až do tejto fázy bolo celé klonovanie uskutočňované v baktériách *E. coli* DH5α.

Príklad 5: Delečná mutagenéza génu pck v kmeni MH20-22B produkujúcom lyzín

Integračným plazmidom pK19mobsacBΔpck boli potom transformované baktérie *E. coli* kmeňa S17-1 (Simon a ďalší, (1983), Bio/Technology 1, strana 784 až 791). Tento kmeň umožňuje prenos plazmidu do baktérií *Corynebacterium glutamicum* pomocou konjugácie (Schäfer a ďalší, (1990) Journal of Bacteriology 172, strana 1663 až 1666). Ako prijemca plazmidu bol vybraný kmeň baktérie *C. glutamicum* MH20-22B produkujúci lyzín (Schrumpf, a ďalší (1992), Applied Microbiology and Biotechnology 37, strana 566 až 571). Po konjugácii baktérií *E. coli* S171/pK19mobsacBΔpck a *C. glutamicum* MH20-22B a následnej selekcii na platniach s Luria-Bertani médiom s prídavkom 25 µg/ml kanamycínu a 50 µg/ml kyseliny nalidixínovej sa získalo viac transkonjugátov. Tieto boli ďalej selektované na komplexnom médiu Luria-Bertani (Sambrook a ďalší; Molecular Cloning: A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) bez antibiotík a s 1% glukózou, pričom sa hľadala druhá rekombinačná udalosť vedúca k excízii vektora i s génom pck. Po napestovaní v tomto médiu boli baktérie vysiate na podobné médium s 10% sacharózou. Na vektore pK19mobsacB obsiahnutý gén sacB kóduje enzým levansukrázu, ktorý syntetizuje levan zo

sacharózy. Vzhľadom na to, že levan je pre baktérie *C. glutamicum* toxický, môžu na médiu so sacharózou rásť len tie bunky *C. glutamicum*, ktoré stratili integračný plazmid (Jäger a ďalší (1992), Journal of Bacteriology 174, strana 5462 až 5466). 30 klonov rezistentných na sacharózu sa testovalo na svoju citlivosť na kanamycín. Pri 11 z testovaných klonov sa okrem rezistencie na sacharózu potvrdila aj požadovaná citlivosť na kanamycín. Pri týchto 11 klonoch došlo k excízii aj pozadia vektora. Ďalšou analýzou sa stanovilo, či došlo aj k požadovanej delécii v genóme. Na to sa použila polymerázová reťazová reakcia (PCR).

Na túto PCR sa použila chromozómová DNA jednej kolónie východiskového kmeňa a 11 kolónií klonov citlivých na kanamycín. Jednotlivé kolónie sa špáradlom odobrali z agarovej platne, suspendovali v 50 µl vody a inkubovali 5 minút pri 95°C. Vždy po 1 µl získanej suspenzie sa použilo ako templát na PCR. Ako priméry sa použili oligonukleotidy, ktoré pokrývajú oblasť od 2136 do 2158 nukleotidu, respektíve od 3815 do 3793 nukleotidu podľa sekvencie id.č: 1. Podmienky PCR boli nasledujúce: počiatočná denaturácia: 150 sekúnd pri 94°C; denaturácia 60 sekúnd pri 94°C; hybridizácia 30 sekúnd pri 60°C; amplifikácia 120 sekúnd pri 72°C; celkom 30 cyklov, zakončených finálnou extenziou 240 sekúnd pri 72°C. V reakčnej zmesi obsahujúcej DANN východiskového kmeňa bol na základe zvolených primérov očakávaný PCR produkt s veľkosťou 1,68 kb. V PCR mixoch obsahujúcich DNA pck-delečných mutantov bol očakávaný PCR produkt s veľkosťou 0,61 kb. Jeden z testovaných klonov skutočne umožnil vzniknúť 0,61 kb dlhému PCR produktu. Tým bola v tomto klone dokázaná požadovaná delécia vnútorného 1071 bp dlhého fragmentu génu pck. Tento klon bol označený MH20-22BApck. V reakčných zmesiach ostatných klonov sa vyskytoval 1,68 kb dlhý PCR produkt. Znamená to teda, že v týchto klonoch sa vektor vybral tak, že bola obnovená východisková situácia genómu.

Kmeň MH20-22B Δ pck ako i východiskový kmeň MH20-22B sa inokulovali do komplexného média Luria-Bertani s prídavkom 1% glukózy. Vo vyrastených bunkách sa potom uskutočnila skúška na PEP-karboxykinázovú aktivitu podľa Bentleho a Lardyho (Journal of Biological Chemistry 251 (1976), strana 2916 až 2921). Z výsledku tejto analýzy (viď tabuľka 2) vyplýva, že v mutantnom kmeni MH20-22B Δ pck nemožno oproti východiskovému kmeňu MH20-22B detegovať žiadnu PEP-karboxykinázovú aktivitu.

Tabuľka 2: PEP-karboxykinázová aktivita v jednotlivých kmeňoch baktérií

Kmeň	PEP-karboxykinázová aktivita (nmol min ⁻¹ na mg proteínu)
MH20-22B	65
MH20-22B Δ pck	< 3 *

* 3 nmol min⁻¹ na mg proteínu je detekčný limit

Príklad 6: Produkcia L-lyzínu

Určoval sa vplyv inaktivácie génu na produkciu lyzínu. Baktérie kmeňa MH20-22B (Schumpf a ďalší, Applied Microbiology and Biotechnology 1992, 37: strana 566 až 571) ako i bunky MH20-22B Δ pck s mutáciou v géne pre PEP-karboxykinázu (viď príklad 5) sa pestovali v komplexnom médiu Luria-Bertani s prídavkom 1% glukózy a potom sa týmito

kultúrami naočkovalo fermentačné médium CGXII (Keilhauer a ďalší, Journal of Bacteriology 1993, 175: strana 5595 až 5603). Použilo sa 5 % inokula pri optickej hustote približne 0,5 pri 600 nm). Toto médium obsahuje ako suplement 3 mM leucín, vzhľadom na to, že obidva kmene sú leucín-auxotrofné. Kultivovalo sa vždy 60 ml kultúry v 500 ml Erlenmeyerových bankách. Po 24 hodinovej kultivácii pri 28°C na rotačnej pretrepávačke typu Certomat S/50 (B. Braun Biotech International Melsungen, Nemecko) pri 120 otáčkach min⁻¹ bola stanovená koncentrácia do média vylúčeného lyzínu.

Stanovenie koncentrácie aminokyselín sa uskutočnilo pomocou vysokotlakovej kvapalinovej chromatografie (HPLC), viď Jones a Gilligan, Journal of Chromatography 1983, 266: strana 471 až 482. Výsledky chromatografického stanovenia - viď tabuľka 3.

Tabuľka 3: Koncentrácia lyzínu v kultivačnom médiu jednotlivých kmeňov

Kmeň	L-Lyzín (mM)
MH20-22B	54
MH20-22BΔpck	65

Príklad 7: Delečná mutagenéza génu pck v baktériách DM368-2 produkujúcich treonín

Podobným spôsobom ako v prípade baktérií MH20-22B produkujúcich lyzín sa uskutočnila s baktériami *E. coli* kmeňa S17-1/pkl9mobsacBΔpck konjugácia s baktériami DM368-2 produkujúcimi treonín s následnou selekciou na prvú a druhú rekombináciu (viď príklad 5). Z celkom 30 klonov

rezistentných na sacharózu bolo 14 citlivých na kanamycín. Z týchto klonov bola pomocou PCR analýzy opísanej v príklade 5 u dvoch klonov označených DM3682 Δ pck16 a DM3682 Δ pck18 dokázaná 1071 bp dlhá delécia v géne pck.

Rovnakým spôsobom ako v príklade 5 sa uskutočnil test enzymatickej aktivity s východiskovým kmeňom DM368-2 a s obidvoma kmeňmi s deléciou v géne pck DM3682 Δ pck16 a DM3682 Δ pck18. Z výsledkov testu vyplýva, že v obidvoch mutantoch nemožno detegovať žiadnu PEP-karboxykinázovú aktivitu, viď tabuľka 4.

Tabuľka 4: PEP-karboxykinázová aktivita v jednotlivých kmeňoch baktérií

Kmeň	PEP-karboxykinázová aktivita (nmol min ⁻¹ na mg proteínu)
DM368-2	79
DM368-2 Δ pck16	< 3
DM368-2 Δ pck18	< 3

* 3 nmol min⁻¹ na mg proteínu je detekčný limit

Príklad 8: Produkcia L-treonínu

Analogicky k pokusom s produkciou L-lyzínu sa testovala aj akumulácia treonínu v kultivačnom médiu PEP-karboxykináza defektného kmeňa DM368-2 Δ pck16 v porovnaní s východiskovým kmeňom DM368-2. Obidva kmene boli napestované v komplexnom médiu Luria-Bertani s prídavkom 1% glukózy a potom preočkované do fermentačného média CGXII. Po 24-hodinovej kultivácii pri

28°C na rotačnej pretrepávačke pri 120 otáčkach min⁻¹ bola stanovená koncentrácia treonínu vylúčeného do média.

Stanovenie koncentrácie aminokyselín sa uskutočnilo pomocou vysokotlakovej kvapalinovej chromatografie (HPLC), viď vyššie. Výsledky chromatografického stanovenia sú v tabuľke 5.

Tabuľka 5: Koncentrácia lyzínu v kultivačnom médiu jednotlivých kmeňov

Kmeň	L-Treonín (mM)
DM368-2	8
DM368-2BΔpck16	22

Prehľad obrázkov na výkresoch:

- Obrázok 1: reštrikčná mapa plazmidu pEK-pckA
- Obrázok 2: reštrikčná mapa plazmidu pEK-pckB
- Obrázok 3: reštrikčná mapa plazmidu pkl9mobsacBΔpck

Údaje o pároch báz sú približné hodnoty opakovane získané pri reštrikčnom štiepení.

Použité skratky a označenia majú nasledujúci význam:

sacB: sacB-gén
ori V: replikačný počiatok V
ori T: replikačný počiatok T
Km-r: rezistencia na kanamycín

KpnI: cieľové miesto reštrikčného enzýmu KpnI
HindIII: cieľové miesto reštrikčného enzýmu HindIII
HindII: cieľové miesto reštrikčného enzýmu HindII
PstI: cieľové miesto reštrikčného enzýmu PstI
SphI: cieľové miesto reštrikčného enzýmu SphI
XbaI: cieľové miesto reštrikčného enzýmu XbaI
SalI: cieľové miesto reštrikčného enzýmu SalI
SacI: cieľové miesto reštrikčného enzýmu SacI
BfrI: cieľové miesto reštrikčného enzýmu BfrI
ScaI: cieľové miesto reštrikčného enzýmu ScaI
BamHI: cieľové miesto reštrikčného enzýmu BamHI
EcoRI: cieľové miesto reštrikčného enzýmu EcoRI
pck`: 3'-koncový fragment génu pck
pck``: 5'-koncový fragment génu pck
pck: gén pck

Opis sekvencií

INFORMÁCIE O SEKVENCII ID. Č. 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 3935 párov báz
- (B) TYP: deoxyribonukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: dve
- (D) TOPOLOGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: genómová DNA

(vi) PÔVOD:

- (A) ORGANIZMUS: *Corynebacterium glutamicum*

(ix) CHARAKTERISTICKÉ RYSY:

- (A) MENO/KLÚČ: CDS
- (B) POLOHA: 2022 až 3851

(xi) OPIS SEKVENCIE ID.Č. 1:

```

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

```

```

tctgcgacga ctggaaaacc atggattttc aacagtgatg acaacaatga gatgcccatg 1080
aggggaaccag cccacgaggg gccaggtgga ggtaagaccg cagcgtagct tttggtcgaa 1140
gaaggagtgg gcatgcccat tactttaagc ctttggggca gtgaaaccgc taaatgggag 1200
cgttgtgcgc tcgatcactg gtctagacct ttgggtcca aaagttgcaa tttcgcgaa 1260
acttcaacac ttgtttgcaa tgtttgttaa taaatgggtt cgctagtggg ttctgtcgtt 1320
agtactggcc gtcgtgggtg ggtcatgtat ttaggtaggg caaagttaag atcagagcac 1380
tttttgatac gactaactgg atataacctt tggggtaacg tggggatgtg tgtgagtaat 1440
tttcaaagta tttaaaaggg ggatctaggg taaaaattt gtttcaagta catatcttta 1500
gltcggtagt tgagggcggg tggtgacagt gcgggcatgc atgtgagtgt aaatgttggt 1560
ttaaaaaggt gtgtactgac agtgggccgg tttgtgctgg tcggccacta gcggagtgtc 1620
tggattgtga tggcagggta agggaaaagg attaccatta ccgctgttct tggcgttttg 1680
ttgcctattg tccgaatgtt aagtgttaat ggtgggaaaa ctgggaaagt tgtcccctgg 1740
aatgtgtgag aattgcccc aatctgaacc aatggccatg gacggggaat gaactgtcgg 1800
agaacgggtt aggttaattc ttgaaaccac ccccaaaata ggctatttaa acgggtgctc 1860
tcatattaaa gaaagtgtgt agatgcgtgt gggcaggggg taggtccact ggtaatgaca 1920
aatgtgtccg ttgtctcacc taaagtttta actagttctg tatctgaaag ctacgctagg 1980
gggcgagaac tctgtcgaat gacacaaaat ctggagaagt a atg act act gct gca 2036
                                     Met Thr Thr Ala Ala
                                     1           5

atc agg ggc ctt cag ggc gag gcg ccg acc aag aat aag gaa ctg ctg 2084
Ile Arg Gly Leu Gln Gly Glu Ala Pro Thr Lys Asn Lys Glu Leu Leu
                10                15                20

aac tgg atc gca gac gcc gtc gag ctc ttc cag cct gag gct gtt gtg 2132
Asn Trp Ile Ala Asp Ala Val Glu Leu Phe Gln Pro Glu Ala Val Val
                25                30                35

ttc gtt gat gga tcc cag gct gag tgg gat cgc atg gcg gag gat ctt 2180
Phe Val Asp Gly Ser Gln Ala Glu Trp Asp Arg Met Ala Glu Asp Leu
                40                45                50

gtt gaa gcc ggt acc ctc atc aag ctc aac gag gaa aag cgt ccg aac 2228
Val Glu Ala Gly Thr Leu Ile Lys Leu Asn Glu Glu Lys Arg Pro Asn
                55                60                65

agc tac cta gct cgt tcc aac cca tct gac gtt gcg cgc gtt gag tcc 2276
Ser Tyr Leu Ala Arg Ser Asn Pro Ser Asp Val Ala Arg Val Glu Ser
                70                75                80                85

```

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

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

```

ggc gca gac gag acc gtt gtt gga cac acc gct aag gcc gaa gac ctc 3668
Gly Ala Asp Glu Thr Val Val Gly His Thr Ala Lys Ala Glu Asp Leu
535 540 545

gac ctc gac ggc ctc gac acc cca att gag gat gtc aag gaa gca ctg 3716
Asp Leu Asp Gly Leu Asp Thr Pro Ile Glu Asp Val Lys Glu Ala Leu
550 555 560 565

acc gct cct gca gag cag tgg gca aac gac gtt gaa gac aac gcc gag 3764
Thr Ala Pro Ala Glu Gln Trp Ala Asn Asp Val Glu Asp Asn Ala Glu
570 575 580

tac ctc act ttc ctc gga cca cgt gtt cct gca gag gtt cac agc cag 3812
Tyr Leu Thr Phe Leu Gly Pro Arg Val Pro Ala Glu Val His Ser Gln
585 590 595

ttc gat gct ctg aag gcc cgc att tca gca gct cac gct taaagttcac 3861
Phe Asp Ala Leu Lys Ala Arg Ile Ser Ala Ala His Ala
600 605 610

gcttaagaac tgctaaataa caagaaaggc tcccaccgaa agtgggagcc tttcttgctcg 3921

ttaagcgatg aatt 3935

```

INFORMÁCIE O SEKVENCII ID. Č. 2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCIE:

(A) DĹŽKA: 610 aminokyselín

(B) TYP: proteín

(C) ORGANIZMUS: *Corynebacterium glutamicum*

(xi) OPIS SEKVENCIE ID.Č. 2

```

Met Thr Thr Ala Ala Ile Arg Gly Leu Gln Gly Glu Ala Pro Thr Lys
1 5 10 15

Asn Lys Glu Leu Leu Asn Trp Ile Ala Asp Ala Val Glu Leu Phe Gln
20 25 30

Pro Glu Ala Val Val Phe Val Asp Gly Ser Gln Ala Glu Trp Asp Arg
35 40 45

Met Ala Glu Asp Leu Val Glu Ala Gly Thr Leu Ile Lys Leu Asn Glu
50 55 60

Glu Lys Arg Pro Asn Ser Tyr Leu Ala Arg Ser Asn Pro Ser Asp Val
65 70 75 80

Ala Arg Val Glu Ser Arg Thr Phe Ile Cys Ser Glu Lys Glu Glu Asp
85 90 95

Ala Gly Pro Thr Asn Asn Trp Ala Pro Pro Gln Ala Met Lys Asp Glu
100 105 110

Met Ser Lys His Tyr Ala Gly Ser Met Lys Gly Arg Thr Met Tyr Val
115 120 125

Val Pro Phe Cys Met Gly Pro Ile Ser Asp Pro Asp Pro Lys Leu Gly
130 135 140

```

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

17.07.01

Met Ala Met Leu Pro Phe Ile Gly Tyr Asn Ala Gly Glu Tyr Leu Gln
465 470 475 480

Asn Trp Ile Asp Met Gly Asn Lys Gly Gly Asp Lys Met Pro Ser Ile
485 490 495

Phe Leu Val Asn Trp Phe Arg Arg Gly Glu Asp Gly Arg Phe Leu Trp
500 505 510

Pro Gly Phe Gly Asp Asn Ser Arg Val Leu Lys Trp Val Ile Asp Arg
515 520 525

Ile Glu Gly His Val Gly Ala Asp Glu Thr Val Val Gly His Thr Ala
530 535 540

Lys Ala Glu Asp Leu Asp Leu Asp Gly Leu Asp Thr Pro Ile Glu Asp
545 550 555 560

Val Lys Glu Ala Leu Thr Ala Pro Ala Glu Gln Trp Ala Asn Asp Val
565 570 575

Glu Asp Asn Ala Glu Tyr Leu Thr Phe Leu Gly Pro Arg Val Pro Ala
580 585 590

Glu Val His Ser Gln Phe Asp Ala Leu Lys Ala Arg Ile Ser Ala Ala
595 600 605

His Ala
610

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Polynukleotid izolovaný z koryneformných baktérií, ktorý obsahuje polynukleotidovú sekvenciu, vybranú zo skupiny tvorenej:

- a) polynukleotidmi, ktoré sú aspoň na 70 % identické s polynukleotidom kódujúcim peptid, ktorého aminokyselinová sekvencia je uvedená v sekvencii id. č. 2,
- b) polynukleotidmi, ktoré sú aspoň na 70 % identické s polynukleotidom kódujúcim uvedený polypeptid, nachádzajúcim sa v plazmide pEK-pckA (viď obrázok 1) respektíve na plazmide pEK-pckB (viď obrázok 2),
- c) polynukleotid, kódujúci peptid, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu, ktorá je aspoň na 70 % identická so sekvenciou aminokyselín podľa sekvencie id.č.: 2,
- d) polynukleotid, komplementárny k polynukleotidu podľa a), b) alebo c) a
- e) polynukleotid, obsahujúci aspoň 15 za sebou idúcich báz z polynukleotidovej sekvencie podľa bodov a), b), c) alebo d).

2. Polynukleotid podľa nároku 1, pričom ide o replikovateľnú, výhodne rekombinantnú DNA.

3. Polynukleotid podľa nároku 1, pričom ide o RNA polynukleotid.

4. Polynukleotid podľa nároku 2, obsahujúci nukleotidovú sekvenciu podľa sekvencie id.č.:1.

5. Replikovateľná DNA podľa nároku 2 obsahujúca:

- (i) nukleotidovú sekvenciu podľa sekvencie id.č.: 1, alebo
- (ii) aspoň jednu sekvenciu, ktorá zodpovedá sekvencii podľa bodu (i) vzhľadom na degeneráciu genetického kódu alebo
- (iii) aspoň jednu sekvenciu, ktorá hybridizuje so sekvenciou podľa bodu (i) alebo (ii) alebo s komplementárnymi sekvenciami, a poprípade
- (iv) funkčne neutrálne mutácie v sekvencii podľa bodu (i).

6. Polynukleotidová sekvencia podľa nároku 2, v y-
z n a č u j ú c a s a t ý m , že kóduje polypeptid,
ktorého aminokyselinová sekvencia obsahuje sekvenciu id.č.: 2.

7. Vektor pEK-pckA podľa obrázka 1.

8. Vektor pEK-pckB podľa obrázka 2.

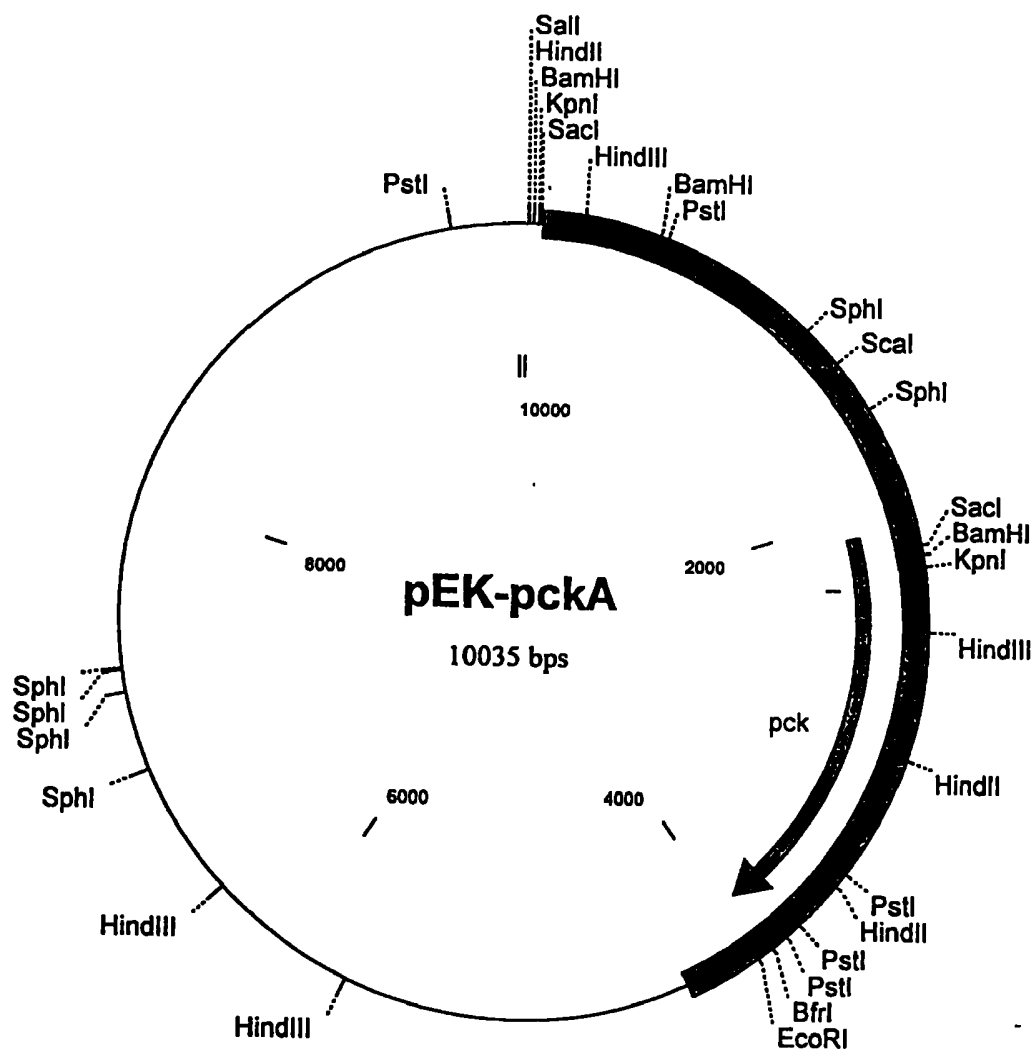
9. Vektor pK19mobsacB Δ pck podľa obrázka 3, ktorý bol uložený
v bunkách *E.coli* kmeňa DH5 α pod číslom DSM13047.

10. Hostiteľské bunky koryneformných baktérií obsahujúce
ľubovoľný z vektorov podľa nárokov 6 až 8 alebo obsahujúce
deléciu Δ pck.

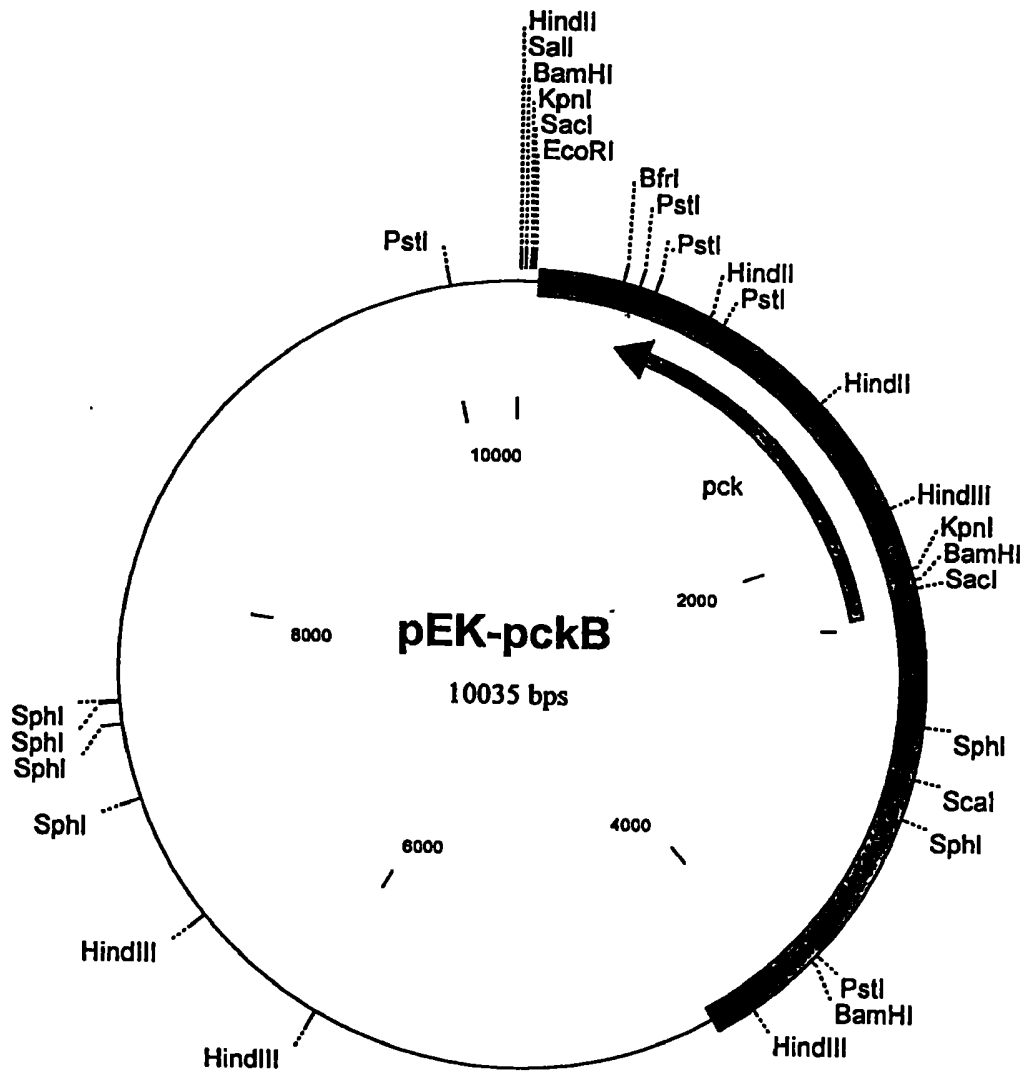
11. Spôsob fermentačnej výroby L-aminokyselín, v y-
z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa použiju
baktérie, pričom sa

- a) oslabí polynukleotid podľa nároku 1 alebo sa zníži aktivita polypeptidu, kódovaného týmto polynukleotidom
- b) koncentrácia požadovaného produktu sa zvyšuje v kultivačnom médiu alebo bakteriálnych bunkách a
- c) izoluje sa produkt.
12. Spôsob podľa nároku 11, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa použijú baktérie druhu *Corynebacterium glutamicum*.
13. Spôsob podľa nároku 11, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa na oslabenie použije integračná mutagenéza pomocou plazmidu pK19mobsacBΔpck podľa obrázka 3 a uloženého pod číslom DSM13047.
14. Spôsob podľa nároku 11, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa na výrobu L-lyzínu použijú baktérie, v ktorých je
- súčasne zvýšená expresia génu dapA pre dihydropikolinát-syntázu a/alebo
 - súčasne amplifikovaný fragment DNA sprostredkovávajúci rezistenciu na S-(2-aminoetyl)-cysteín.
15. Spôsob podľa nároku 11, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa na výrobu L-treonínu použijú baktérie, v ktorých je súčasne zvýšená expresia génu hom pre homoserín-dehydrogenázu a/alebo je súčasne zvýšená expresia alely hom^{dr} , respektíve hom^{FBR} kódujúcej homoserindehydrogenázu rezistentnú na spätnoväzbovú reguláciu.

Obrázok 1



Obrázok 2



Obrázok 3

