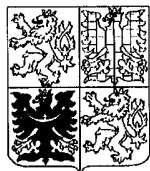


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **30.08.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **09.09.1999 30.06.2000**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/19943055 2000/10031999**

(33) Země priority: **DE DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.03.2001**
(Věstník č. 3/2001)

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 3156

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/54

C 12 N 15/77

C 12 P 13/02

//(C 12 N 15/54, C 12 R 1:15)

(71) Přihlašovatel:

DEGUSSA-HÜLS AKTIENGESSELLSCHAFT,
Frankfurt am Main, DE;
INSTITUT FÜR INNOVATIONSTRANSFER AN
DER UNIVERSITÄT BIELEFELD GMBH, Bielefeld,
DE;

(72) Původce:

Dusch Nicole Dr., Bielefeld, DE;
Thierbach Georg Dr., Bielefeld, DE;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní třída 32, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob fermentativní výroby kyseliny D-
pantotenové za použití koryneformních bakterií**

(57) Anotace:

Popisuje se způsob výroby kyseliny D-pantotenové fermentací koryneformních bakterií, při kterém se použijí bakterie, ve kterých se zesílí, zejména nadměrně exprimuje sekvence nukleotidu (pyc-gen) kódující pyruvátkarboxylázu (EC-číslo 6.4.1.1), přičemž se provádí následující kroky: a) fermentace bakterií produkujících kyselinu d-pantotenovou, ve kterých je přinejmenším zesílen gen kódující pyruvátkarboxylázu, b) obohacení kyseliny D-pantotenové v médiu nebo v buňkách bakterií a c) izolace produkované kyseliny D-pantotenové.

30.08.00

P/1111-2156

61295

Způsob fermentativní výroby kyseliny D-pantotenové za použití koryneformních bakterií

Oblast vynálezu

Vynález se týká způsobu fermentativní výroby kyseliny D-pantotenové za použití koryneformních bakterií, ve kterých je při nejmenším zesílen pyc-gen.

Dosavadní stav techniky

Kyselina pantotenová představuje komerčně významný vitamin, který se používá v kosmetice, lékařství, lidské výživě a v krmivu pro zvířata.

Kyselina pantotenová se může vyrábět chemickou syntézou nebo biotechnicky fermentací vhodných mikroorganismů ve vhodných živných roztocích. Při chemické syntéze je důležitým mezistupněm DL-pantolakton. Tento se vyrábí několikastupňovým způsobem z formaldehydu, isobutyraldehydu a kyanidu. Při dalších stupních způsobu se racemická směs rozdělí, D-pantolakton se kondenzuje s β -alaninem a tak se získá požadovaná kyselina pantotenová.

Přednost výroby fermentací mikroorganismů spočívá v přímé tvorbě požadované stereoisomerní D-formy, která neobsahuje kyselinu L-pantotenovou.

Různé druhy bakterií, jako například B. Escherichia coli, Arthrobacter ureafaciens, Corynebacterium erythrogenes, Brevibacterium ammoniagenes a rovněž kvasinky, jako například B. Debaromyces castellii, mohou jak je to uvedeno v EP-A 0 493 060, produkovat v živném roztoku, který obsahuje glukózu, kyselinu DL-panto-

inovou a β -alanin, kyselinu D-pantotenovou. EP-A-0 493 060 dále uvádí, že se u *Escherichia coli* pomocí amplifikace biosyntézních genů kyseliny pantotenové z *E. coli*, které jsou obsaženy na plasmidech pFV3 a pFV5, v živném roztoku, který obsahuje glukózu, kyselinu DL-pantoinovou a β -alanin, zlepší tvorba kyseliny pantotenové.

EP-A- O 590 857 a US patent 5, 518 906 popisují mutanty odvozené od kmene IF03547 *Escherichia coli*, jako například FV5714, FV525, FV521, FV221, FV6051 a FV5069, které nesou rezistenty vůči různým metabolitům jako například kyselině salicylové, kyselině α -ketoisovalerové, kyselině β -hydroxyasparagové, O-methylthreoninu a kyselině α -ketoisovalerové. Tyto produkují v živém roztoku, který obsahuje glukózu, kyselinu pantoinovou, a v živném roztoku, obsahujícím glukózu a - - alanin. kyselinu D-pantotenovou. V EP-A O 590 857 a v US patentu 5, 518 906 se dále uvádí, že po amplifikaci biosyntézních genů kyseliny pantotenové, které jsou obsaženy na plasmidu pFV31, se ve shora uvedených kmelech v živných roztocích obsahujících glukózu, zlepší produkce kyseliny D-pantoinové a v živném roztoku, který obsahuje glukózu a -alanin, se zlepší produkce kyseliny D-pantotenové.

Základní úlohou vynálezu je dát k dispozici nové základy pro zlepšený způsob výroby kyseliny pantotenové za využití koryneformních bakterií.

Podstata vynálezu

Vitamin kyselina pantotenová představuje komerčně významný produkt, který se používá v kosmetice, lékař-

ství, humánní výživě a v krmivech pro zvířata. Všeobecně se přikládá velký význam tomu, aby byl k dispozici zlepšený způsob výroby kyseliny pantotenové,

Jestliže se dále mluví o kyselině D-pantotenové nebo kyselině pantotenové nebo o pantotenátu, jsou tím míněny nejen volné kyseliny, nýbrž i sole kyseliny D-pantotenové, jako například vápenatá sůl, sodná sůl, amonná sůl nebo draselná sůl.

Předmětem vynálezu je způsob fermentativní výroby kyseliny D-pantotenové za použití koryneformních bakterií, ve kterých se zesiluje sekvence nukleotidu kodující enzym pyruvatkarboxylázu /EC-číslo 6.4.1.1/, a zejména se nadměrně exprimuje.

Použité kmeny produkují popřípadě již před zesílením pyc-genu kyselinu D-pantotenovou.

Výhodné formy provedení jsou popsány v nárocích.

Pojem "zesílení" popisuje v této souvislosti zvýšení intracelulární aktivity jednoho nebo několika enzymů v mikroorganismu, které se kodují vhodnou DNA, tím že se například zvýší počet kopií genu popřípadě genů, použije se silný promotor nebo se použije gen, který koduje odpovídající enzym vysokou aktivitou a popřípadě kombinuje tato opatření.

Mikroorganismy, které jsou předmětem předloženého vynálezu, mohou kyselinu D-pantotenovou vyrábět z glukózy, sacharózy, laktózy, fruktózy, maltózy, melasy, škrobu, celulózy nebo z glycerinu a ethanolu. Jedná se o zástupce koryneformních bakterií, zejména druhu *Corynebacterium*. U druhu *Corynebacterium* je třeba uvést především druh *Corynebacterium glutamicum*, o němž je odbornému světu známo, že produkuje L-aminokyseliny.

Vhodné kmeny druhu *Corynebacterium*, zejména druhu *Corynebacterium glutamicum*, jsou například známé typy divokých kmenů.

Corynebacterium glutamicum ATCC13032

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870

Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539

Brevibacterium flavum ATCC14067

Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 a

Brevibacterium divaricatum ATCC14020

a z nich vyrobené mutanty produkující kyselinu D-pantotovou.

Bylo nalezeno, koryneformní bakterie po nadměrné expresi *pyc*-genu kodujícího pro pyruvatkarboxylázy /EC-číslo 6.4.1.1./ produkují zlepšeným způsobem kyselinu pantotovou.

Pyc-gen koduje pro enzym pyruvátkarboxylázu /EC-číslo 6.4.1.1./, který katalyzuje karboxylaci pyruvatu na octan kyseliny oxalové. Sekvence nukleotidu *pyc*-genu je zveřejněna v DE-A-198 31 609 a byla rovněž popsána Koffas et al. /Applied Microbiology and Biotechnology 50, 346-352 /1998// a Peters-Wendisch et al. /Microbiology 144, 915-927 /1998//. Tato je obecně k dispozici u Nukleotidsequenzdaten-Bank des National Center for Biotechnology Information /NCBI, Bethesda, MD, USA/ pod accession number Y09548. *Pyc*-gen popsáný na uvedených místech textu se může používat podle vynálezu. Dále se mohou používat alely *pyc*-genu, které vyplývají z degenerace genetického kódu nebo se získají z funkčně neutrálních odpovídajících mutací / sense mutation/.

Pro dosažení uesílení / například nadměrnou expre-

sí/ se zvýší například počet kopií příslušných genů nebo mutuje region promotoru a regulační region nebo vazební místo místo ribosomů, které se nachází ve směru proti proudu struktury genu. Pomocí indukovatelných promotorů je dále možné zvýšit expresi během fermentační tvorby kyseliny pantotenové. Pomocí opatření sloužících k prodloužení životnosti m-RNA se rovněž zlepší exprese. Dále se zabráněním odbourání proteinu enzymu rovněž zesílí aktivita enzymu. Geny nebo konstrukce genů jsou při tom přítomny buď v plasmidech s různým počtem kopií nebo jsou integrovány v chromosomech a amplifikovány v chromosomech. Alternativně se může dále dosáhnout nadměrné exprese dotyčných genů změnou složení médií a vedením kultivace.

Návody k tomu najde odborník mimo jiné u Martin et al. /Bio/Technology 5, 137-146 /1987//, u Guerrero et al., /Gene 138, 35-41 /1994/, Tsuchiya a Morinaga /Bio/Technology 6, 428-430 /1988//, u Eikmanna et al. /Gene 102, 93-98 /1991//, v evropském patentovém spisu EPS O 472 869, v US patentu 4, 601 893, u Schwarzer a Pühler /Bio/Technology 9, 84-87 /1991/, u Reinscheid et al. /Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 /1994/. u Lassarre et al., /Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 /1993/, v patentové přihlášce WO 96/15246, u Malubres et al. /Gene 134, 15-24 /1993/, v japonském zveřejňovacím spisu JP-A-10-229891, u Jensen und Hammer /Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 /1998/ a ve známých učebnicích genetiky a molekulární biologie.

Příklad plasmidu s jehož pomocí se pyruvatkarboxyláza nadměrně exprimuje, je plasmid pVWExp1pyc, který

je zveřejněn v DE-A-198 31 609, a spočívá na výchozím vektoru pVWExl. Plasmid pVWExl obsahuje jako složky mimo jiné sekvence plasmidu pBL1, tac-promotor a lacI^q-alelu. Jiné v *C. glutamicum* replikovatelné vektory plasmidu, jako například pEKExl /Eikmanns et al., Gene 102:93-98 /1991/ / nebo pZ8-1 evropský patentový spis O 375 889/, se mohou používat stejným způsobem.

Dále může být pro produkci kyseliny pantotenové výhodné, vedle genu kodujícího pyruvátcarboxylázu, zesilovat nebo zejména nadměrně exprimovat jeden nebo několik genů kodujících biosyntetické cestou enzymy kyseliny pantotenové, jako například

panD-gen kodující aspartatdekarboxylázu /Dusch et al., Applied and Environmental Microbiology 65, 1530-1539 /1999/ nebo

panB-gen kodující ketopantoáthydroxymethyltransferázu /Sahm et al., Applied and Environmental Microbiology, 65, 1973-1979 /1999/ nebo

panC-gen kodující pantotenátsynthetasu /Sahm et al., Applied and Environmental Microbiology 65, 1973-1979 /1999/ nebo

ilvD-gen kodující dehydratázu dihydroxykyseliny.

Dále může být pro produkci kyseliny pantotenové výhodné, když se vedle nadměrné exprese zabrání průběhu nežádoucích vedlejších reakcí pyruvátcarboxylázy. /Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", v : Overproduktion of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek /eds./, Academic Press, London, UK, 1982/.

Mikroorganismy vyrobené podle vynálezu se mohou kultivovat kontinuálně nebo diskontinuálně způsobem batch vsázková kultivace/ nebo fed batch /přítokový způsob/ nebo repeated fed batch způsobem / opakovaný přítokový způsob/ pro produkci kyseliny pantotenové.

Souhrn známých kultivačních metod je v učebnici Chmiel /Bioprozesstechnik 1. Einführung in die bioverfahrenstechnik /Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991/ nebo v učebnici Storhas /Bioreaktoren und periphere Einrichtungen /Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesenbach, 1994/.

Kultivační médium které se má používat, musí vhodným způsobem odpovídat nárokům stávajících mikroorganismů.

Popisy kultivačních médií různých mikroorganismů jsou obsaženy v příručce "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology/ Washington D.C., USA, 1981/. Jako zdroj uhlíku se mohou používat cukr a uhlohydráty, jako například glukóza, sacharóza, laktóza, fruktóza, maltóza, melasa, škroby a celulóza, oleje a tuky, jako například sojový olej, slunečnicový olej, podzemnicový olej a kokosový olej, mastné kyseliny, jako například kyselina palmitová, kyselina stearová a kyselina linčiová, alkoholy jako například glycerin a ethanol a organické kyseliny jako například kyselina octová. Tyto látky se mohou používat jednotlivě nebo ve směsi. Jako zdroj dusíku se mohou používat organické sloučeniny, obsahující dusík, jako například peptony, extrakt kvasnic, masový extrakt, sladový extrakt, pramenitá voda z kukuřice, moučka ze sojových bobů a močovina nebo anorganické sloučeniny jako například síran amonný, chlorid amonný, fosforečnan amonný, uhličitán amonný a dusičnan amonný. Zdroje dusíku se mohou používat jednotlivě nebo jako směs. Jako

zdroj fosforu se mohou používat dihydrogenfosforečnan draselný nebo hydrogenfosforečnan dvojdraselný nebo odpovídající sole obsahující sodík. Kultivační médium musí dále obsahovat sole kovů, jako například síran hořečnatý nebo síran železa, které jsou nezbytné pro růst. Konečně se mohou používat esenciální růstové látky, jako aminy a vitaminy přidavně ke shora uvedeným látkám. Ke kultivačnímu médiu se pro další zvýšení produkce kyseliny pantotenové mohou přidávat předstupně kyseliny pantotenové, jako například aspartát, β -alanin, ketoisovalerát, kyselina ketopantoinová nebo kyselina pantoinová a popřípadě jejich sole. Uvedené přidavné látky se mohou přidávat ke kultuře ve formě jednorázové vsázky nebo se mohou vhodným způsobem přidávat během kultivace.

Pro kontrolu pH kultury se přidávají vhodným způsobem zásadité sloučeniny jako například hydroxid sodný, hydroxid draselný, amoniak nebo kyselé sloučeniny jako například kyselina fosforečná nebo kyselina sírová. Pro kontrolu vývoje pěny se mohou přidávat odpěňovací prostředky jako například polyglykolester mastné kyseliny. Pro udržení stability plasmidů se mohou k médiu přidávat vhodné, selektivně účinné látky, například antibiotika. Aby se udržely aerobní podmínky zavádí se do kultury kyslík nebo plyná smění, obsahující kyslík, jako například vzduch. Teplota kultury se pohybuje normálně okolo 20 ° až 45 °C a s výhodou okolo 25 °C až 40 °C. V kultivaci se pokračuje tak dlouho dokud se nevytvoří maximum kyseliny pantotenové. Tento cíl se obvykle dosáhne během 10 hodin až 160 hodin.

Koncentrace vytvořené kyseliny pantotenové se může stanovit známými způsoby /Velisek: Chromatographic Scien-

ce 60, 515-560 /1992/.

Následující mikroorganismus byl uložen bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen /DSMZ, Braunschweig, Deutschland/ podle budapeštské úmluvy 1. července 1999:

Corynebacterium glutamicum DG52-5/pVWExlpyc jako DSM12893.

Příklady provedení vynálezu

Předložený vynález je dále blíže vysvětlen pomocí příkladů provedení.

Za tímto účelem byly provedeny pokusy s kmenem ATCC132AilvA chudým na isoleucin, který byl uložen jako DSM12455 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig /Deutschland/ podle budapeštské úmluvy.

Příklad 1

Výroba kmene ATCC13032 ivA/pVWE1pyc

Pomocí elektroporace /Tauch et al., 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-347/ plasmidu pVWExlpyc /DE-A-198 31 609/ do kmene *C. glutamicum* ATCC13032AilvA a následující selekcí na LB-agaru /Lennox, 1955, Virology, 1:190-206/ + 25 µg/ml kanamycinu se získal kmen ATCC13032AilvA/pVWExlpyc.

Příklad 2

Výroba kyseliny pantotenové

Tvorba pantotenátu pomocí kmenů *C. glutamicum* ATCC13032AilvA a ATCC13032AilvA/pVWExlpyc byla zkoušena v médiu CGXII /Keilhauer et al., 1993, Journal of Bacteriology, 175:5595-5603; tabulka 4/, které bylo suplementováno s 25 µg/ml kanamycinu a 25 µg/ml isoleucinu. Toto médium se

dále označuje jako C. glutamicum testovací médium. Po 50 ml čerstvě nasazeného C. glutamicum testovacího média bylo naočkováno 16 hodin starou předkulturou stejného média, tak, aby optická hustota suspence kultury /o.D.₅₈₀ byla na začátku inkubace 0,1. Po 24 hodinové inkubaci při 30 °C a 175 ot/min byla určována optická hustota /o.D.₅₈₀/ kultury a nakonec byly buňky odstraněny 10 minutovým odstředováním při 5000 g a přesah byl sterilizován.

Pro stanovení optické hustoty se použil Novaspec II fotometr firmy Pharmacia /Freiburg, Deutschland/ při délce měřených vln 580 nm.

Kvantifikace D-pantotenátu v přesahu kultury se prováděla pomocí Lactobacillus plantarum ATCC 8014 podle údajů v příručce firmy DIFCO /DIFCO MANUAL, 10th Edition, s. 1100-1102; Michigan, USA/. Pro kalibraci byla použita hemivápenatá sůl pantotenátu firmy Sigma /Deisenhofen, Deutschland/.

Výsledky produkce pantotenátu pomocí kmenů ATCC13032ΔilvA a ATCC13032ΔilvA/pVWExlpyc jsou shrnuty v tabulce 1.

Tabulka 1

kmen	gen	hustota buněk oD ₅₈₀	koncentrace /ng/ml/
ATCC13032 ilvA	-	11,3	3,8
ATCC13032 ilvA/pVWExlpyc	pyc	9,3	8,5

Příklad 3

Výroba plasmidu pXT-panD

3.1 Výroba kolísavého vektoru E. coli-C-glutamicum pEC-XT99A

Jako výchozí vektor pro konstrukci Shuttle-expressního vektoru E. coli-C-glutamicum pEC-XT99A byl použit expresní vektor E.coli pTRC99A /Amann et al., 1988, Gene 69:301-315/. Po BspHI restričním štěpení /Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktionsbeschreibung BspHI, Product No. 1467123/ a následujícím zpracováním podle Klenowa /Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland, Produktionsbeschreibung Klenow Fragment of DNA Polymerase I, Product No. 27-0928-01; Methode nach Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor/ byl resistantní gen ampicilinu /bla/ vyměněn za tetracyklonový resistantní gen C-glutamicum plasmidu pAG1 /GenBank Accession No. AF121000/. Za tím účelem byla oblast nesoucí rezistentní gen jako AluI fragment /Amersham Pharmacia Biotech., Freiburg, Deutschland, Produktionsbeschreibung AluI No. 27-0884-01/ klonována v linearizovaném expresním vektoru E. coli pTRC99A. Ligace byla provedena tak, jak to bylo popsáno Sambrookem et al.,/1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor/, přičemž směs DNA s T4-ligázou /Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland, Produktionsbeschreibung T4-DNA-Ligase, Product No. 27-0870-04/ byla inkubována přes noc. Tato ligační směs byla potom elektroporirována do kmene E. coli /Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649/ /Tauch et al. 1994, FEMS Microbiology Letters, 123:343-7/. Zkonstruovaný expresní vektor E. coli byl označen

pXT99A.

Jako báze pro klonování minimálního replikonu z *Corynebacterium glutamicum* se použil plasmid pGAl Sonnen et al., 1991, Gene, 107: 69-74/. BaII/PstI-restrunkčním štěpením /Promega GbmH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung BaII, Produkt No. R6691; Amersham Pharmacia Biotech., Freiburg, Deutschland Produktbeschreibung PstI, Produkt No. 27-0976-01/ vektoru pGAl se mohl klonovat 3484 bp velký fragment do vektoru pK18mob2 /Tauch et al., 1998, Archives of Microbiology 169:303-312/ fragmentovaného SmaI a PstI /Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg Deutschland, Produktbeschreibung SmaI, Produkt No. 27-0942-02, Produktbeschreibung PstI, Produkt No. 27-0876-01/. Pomocí BamHIPXhoI restrinkčního štěpení /Amersham Pharmacia Biotech., Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Produkt No. 27-0950-01/ a následujícím zpracováním podle Klenowa /Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Klenow Fragment of DNA Polymerase I, Produkt No. 27-0928-01/; Methode nach Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor/se deletoval 839 bp velký fragment. Z konstruktu religovanému T4-ligasou /Amersham Pharmacia Biotech., Freiburg, Deutschland, Produktionsbeschreibung T4-DNA-ligase, Produkt No. 27-0870-04/ se mohl klonovat C.glutamicum minimální replikon jako 2645 bp velký fragment do expresního vektoru E. coli pXT 99A. Za tím účelem se DNA konstruktu nesoucího minimální replikon štěpila restrinkčními enzymy KpnI / Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland, Produkt beschreibung KpnI, Produkt No. 27-0908-01/ a PstI /Amersham Pharmacia Biotech., Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung PstI, Produkt No. 27-0886-03/ a potom se pomocí Klenovy

polymerázy /Amersham Pharmacia Biotech., Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Klenow Fragment of DNA Polymerase I, Product No. 27-0928-01/ provedlo zpracování 3'-5' exonukleázou /sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor/.

V paralelní vsázce byl expresní vektor E. coli nXT 99A rozštěpen restrinkčním enzymem RsrII / Roche Diagnostica, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung RsrII, Product No. 1292587 a s Klenovou polymerázou /Amersham Pharmacia Biotech., Freiburg, Deutschland, Klenow Fragment of DNA Polymerase I, Product No. 27-0928-01/ připraven k ligaci. Ligace minimálního replikonu s konstruktem vektoru pXT99A byla provedena, jak je to popsáno Sambrookem et al., /1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold, Spring, Harbor/, přičemž směs DNA a T4-ligasou /Amersham Pharmacia Biotech., Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA Ligase, Product No. 27-0870-04/ se inkubovala přes noc.

Takto zkonstruovaný E.coli ^{C-}glutamicum Shuttleuv expresní vektor pEC-XT99A se transformoval pomocí elektroporace do C-glutamicum DSM5715. Selektce transformantů se prováděla na LBHIS agaru, sestávajícího z 18,5 g/l broulíonu mozku a srdce, 0,5 M sorbitolu, 5 g/l bacto-tryptonu, 2,5 g/l bacto-yeast extraktu, 5 g/l NaCl a 18 g/l bacto-agaru, který byl doplněn 5 mg/l tetracyklinu, Inkubace se prováděla dva dny při 33 °C.

Plasmid DNA byl izolován z transformantů obvyklými metodami /Peters-Wendisch et al., 1998, Microbiology, 144, 915-927/ řezán restrikční endonukleázou HindIII a plasmid byl přezkoušen následující elektroforézou s agarózovým gelem.

Takto získaný konstrukt plasmidu byl označen jako pEC-XT99A, a je znázorněn na obr. 1. Kmen, získaný elektroporací plasmidu pEC-XT99A v do kmene *Corynebacterium glutamicum* DSM5715, byl nazván DSM5715/pEC-XT99A a uložen jako DSM12967 *at* bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen /DSMZ, Braunschweig, Deutschland/ podle budapeštské úmluvy.

3,2 Výroba plasmidu pXT-panD

Vycházejí ze sekvencí nukleotidů genu panD *C. glutamicum* ATCC13032 /Dusch et al., /Applied and Environmental Microbiology 65/4/, 1530-1539 /1999/ a DE 1985313.7/ biosyntézy pantotenátu, byly PCR-primery vybrány tak, aby amplifikovaný fragment obsahoval gen s jeho nativními vazebními místy ribosomů. 405 bp velký fragment amplifikovaný s PCR-primerem panD-Cg1/5'-CATCTCACGTATGAATTCT-3'/ a panD-Cg2 /5'-ACGAGGCTTGCAAGCAATA-3/ byl v důsledku údajů výrobce ligován vektoru pCR^R2.1 /Original TA Cloning Kit, Invitrogen /Leek, Niederlande/, Produktbeschreibung Original TA Cloning^R Kit, Cat. no KNM2030-01/ a potom transformován do kmene *E. coli* TOP10F'/Katalog " Invitrogen 2000" firmy Invitrogen, Groningen, Niederlande/. Selektce na transformantech se prováděla inkubací při 37 °C po 24 hodin na LB-agarových deskách se 100 µg/ml ampicilinu a 40 µg/ml X-Gal /5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktosid/.

DNA takto zkonstruovaného plasmidu pCR-D2 se izoloval obvyklou metodou z transformantu, byl stráven ekstrinkčními endonukleázami SacI a XbaI a ligován do rovněž rozštěpeného vektoru pEC-XT99A. Vzhledem k tomu, že druhé Xba-řezné místo, které leží v panD-kodujícím regionu, je v hostiteli *E. coli* Top10F přítomno methylované, nerozřízlo se toto štěpné místo a gen se následovně vyřízl intaktně pomocí bočních SacI a XbaI řezných míst z plasmidu pCR-D2.

Po ligaci se vsázka elektroporovala do kmene *E. coli* DH5 mcr. Selekcce se prováděla na LB agarových deskách s 50 µg/ml kanamycinu. Plasmid DNA z tokto získaných transformantů se izoloval, štěpil s restričními endonukleázami *SacI* a *XbaI* a fragmenty byly potom přezkoušeny elektroforézou na agarozovém galu. Takto zkonstruovaný plasmid byl označen jako pXT-panDa je znázorněn na obr. 2.

Příklad 4

Výroba producentů kyseliny pantotenové ATCC13032 *ilvA/pVWx1pyc*, pXT-panD

V příkladu 3 popsany plasmid pXT-panD byl elektroporován do kmene *C. glutamicum* ATCC13032 Δ *ilvA/pVWx1pyc*. Po dvoudenní selekci při 30 °C na LB-agaru, který byl doplněn 10 µg/ml tetracyklinu a 25 µg/ml kanamycinu, se získal kmen ATCC13032 Δ *ilvA/pVWEx1pyc*, pXT-panD.

Příklad 5

Výroba kyseliny pantotenové

Tvorba pantotenátu pomocí kmenů *C. glutamicum* ATCC13032 Δ *ilpyc*, pXT-pan-D a ATCC13032 Δ *ilvA/pXTpanD* bylo zkoušeno v médiu CGXII / Keilhauer et al., 1993, Journal of Bacteriology, 175:5595-5603, tabulka 2/, které bylo doplněno 10 µg/ml tetracyklinu, 2 mM isoleucinu a v případě kmene ATCC13032 *ilvA/pVWEx1pyc*, pXT-panD dodatečně 25 µg/ml kanamycinu.

Toto médium bylo dále označeno jako testovací médium *C-glutamicum*. Po 50 ml čerstvě nasazeného testovacího média *C. glutamicum* bylo naočkováno 16 hodin starou předkulturu stejného média tak, aby optická hustota kultivační suspence 1/o, D. 580 byla na začátku inkubace

O.l. Kultury byly inkubovány při 30 °C a 130 ot./min. Po pětihodinové inkubaci byl přidán IPTG /isopropyl- β -D-thiogalaktosid/ v konečné koncentraci 1 mM. Po 48hodinové inkubaci byla určována optická hustota /o.D.₅₈₀/ kultury a potom byly buňky odstraněny pomocí 10minutové inkubace při 5000 g a přesah byl sterilizován.

Pro stanovení optické hustoty byl použit Novaspec II fotometr firmy Pharmacia / Freiburg, Deutschland / při délce měřených vln 580 nm.

Kvantifikace D-pantotenátu v kultivačním přesahu se prováděla pomocí *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 podle údajů v příručce firmy DIFCO /DIFCO MANUAL, 10th Edition, s. 1100-1102; Michigan, USA/. Pro kalibraci byla použita hemivápenatá sůl pantotenátu firmy Sigma /Deisenhofen, Deutschland/.

Výsledek je znázorněn v tabulce 3.

30.08.00

-17-

Tabulka 2

látko	množství na litr	poznámka
$/\text{NH}_4/2\text{SO}_2$	20 g	
močovina	5 g	
KH_2PO_4	1 g	
K_2HPO_4	1 g	
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,25 g	
MOPS	42 g	
CaCl_2	10 mg	
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	10 mg	
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	10 mg	
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	1 mg	
CuSO_4	0,2 mg	
$\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0,02 mg	
biotin	0,5 mg	
glukóza	40 g	autoklávováno odděleně
kyselina protokatechová	0,03 mg	sterilizováno

Tabulka 3

kmen	gen	hustota buňky oD_{580}	koncentrace /ng/ml/
ATCC13032 ilvA/pVWx1pyc	pyc	17	8,3
ATCC13032 ilvA/pVWE1pyc	pyc	19	172
pxT-panD	panD		

Přehled obrázků na výkrese

Jsou připojeny následující obr.:

obr. 1: restrikční karta plasmidu pEC-XT99A

obr. 2: restrikční karta plasmidu pXT-panD

U údaje párových čísel bází se jedná o přibližné hodnoty, které se získají v rámci reprodukovatelnosti.

Použité zkratky a označení mají následující význam:

'lacZ	3'-termin fragmentu genu lacZ α
lacIq:	LacIq alela lac represního orgánu
lacZ':	5'-termin lacZ α fragmentu genu
oriV:	původ replikace V
panD:	gen aspartatdekarboxylázy
per:	gen pro kontrolu počtu kopií
Ptrc:	trc-promotor
rep:	replikační region pro C. glutamicum
T1:	transkripční terminátor T1
T2:	transkripční terminátor T2
Tet:	rezistentní gen tetracyklinu
BamHI:	řezné místo restrikčního enzymu BamHI
DraI:	řezné místo restrikčního enzymu DraI
EcoRI:	řezné místo restrikčního enzymu EcoRI
EcoRV:	řezné místo restrikčního enzymu EcoRV

HindIII:	řezné místo restrikčního enzymu HindIII
KpnI:	řezné místo restrikčního enzymu KpnI
NdeI:	řezné místo restrikčního enzymu HdeI
NotI:	řezné místo restrikčního enzymu NotI
NruI:	řezné místo restrikčního enzymu NruI
PatI:	řezné místo restrikčního enzymu PatI
SacI:	řezné místo restrikčního enzymu SacI
SaII:	řezné místo restrikčního enzymu SaII
SmaI:	řezné místo restrikčního enzymu SmaI
XbaI**	methylované řezné místo XbaI
XbaI:	řezné místo restrikčního enzymu XbaI

30.08.00

PVWto - 3153

61295

-20-

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob fermentativní výroby kyseliny D-pantoteno-
véza použitím koryneformních bakterií, v y z n a č u j í -
c í s e t í m, že se použijí bakterie, ve kterých se
zesílí sekvence nukleotidu /pyc-gen/, kodující pyruvát-
karboxylázu /EC-číslo 6.4.1.1./, a zejména se nadměrně
exprimuje.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e
t í m, že se použijí bakterie, ve kterých se dále zesílí
další geny cesty biosyntézy kyseliny D-pantotenové.

3. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e
t í m, že se použijí bakterie, ve kterých jsou při nej-
menším částečně vyraženy cesty látkové výměny, které zmen-
šuje tvorba kyseliny D-pantotenové.

4. Způsob podle jednoho nebo několika předcházejících
nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se použi-
je kmen transformovaný vektorem plasmidu, a vektor plas-
midu nese sekvenci nukleotidu kodující pyruvátkarboxylázu.

5. Způsob podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e
t í m, že se použijí bakterie transformované plasmidem
pVWExlpyc.

6. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í
s e t í m, že se současně zesílí panD-gen kodující as-
partátdekarboxylázu.

7. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e
t í m, že se současně zesílí panB-gen kodující ketopan-
toáthydroxymethyltransferázu.

8. Způsob podle nároku 1, v y z n a ě u j í c í s e t í m, že se současně zesílí paC-gen kodující pantotenátsyntetázu.

9. Způsob podle nároku 1, v y z n a ě u j í c í s e t í m, že se současně zesílí ilvD-gen kodující dehydratázu dihydroxykyseliny.

10. Způsob podle jednoho nebo několika předcházejících nároků, v y z n a ě u j í c í s e t í m, že se uvedené geny zesílí v koryneformních bakteriích, které již produkují kyselinu D-pantotenovou.

11. Způsob fermentativní výroby kyseliny D-pantotenové podle jednoho nebo několika předcházejících nároků, v y z n a ě u j í c í s e t í m, že se provedou následující kroky:

- a/ fermentace bakterií produkujících kyselinu D-pantotenovou, ve kterých se při nejmenším zesílí gen kodující pyruvatkarboxylázu,
- b/ obohacení kyseliny D-pantotenové v médiu nebo v buňkách bakterií a
- c/ izolace produkované kyseliny D-pantotenové.

12. Koryneformní bakterie, ve kterých jsou zesíleny, zejména nadměrně exprimovány sekvence nukleotidu /pyc-gen/ kodující pyruvatkarboxylázu /EC-číslo 6.4.1.1./.

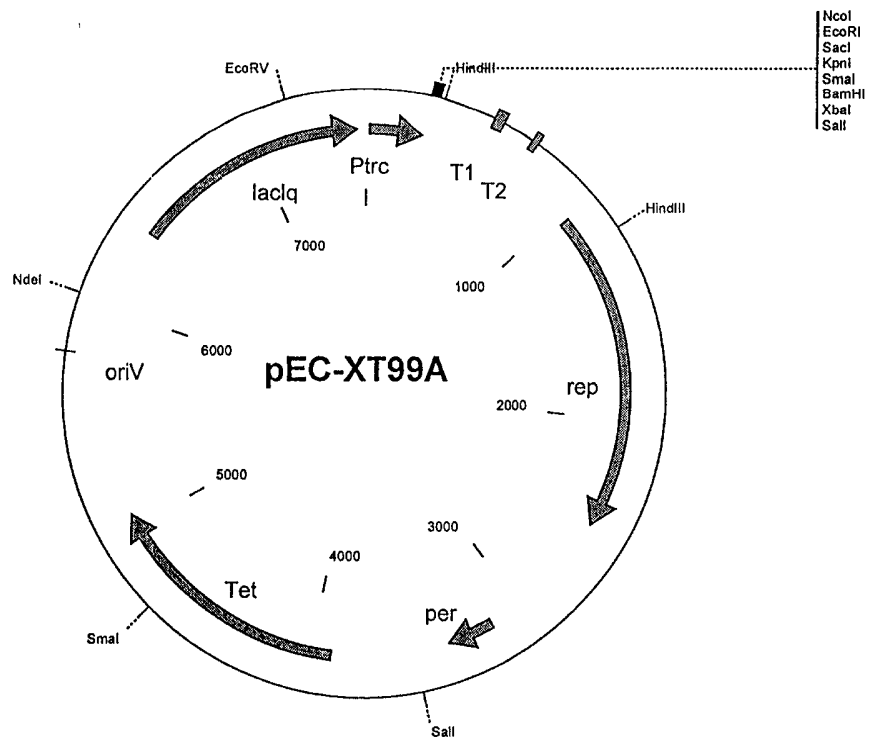
13. *Corynebacterium glutamicum* DG 52-5/pVWExp_{pyc} uložené pod číslem DSM 12893 u DSMZ, Braunschweig.

30.08.00

PV1000-8156

61295

OBR: 1



30.08.00

OBR. 2

