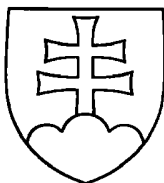


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA
VYNÁLEZU

(21) Číslo dokumentu:

1377-99

- (22) Dátum podania: 07.10.1999
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 198 46 499.1
(32) Dátum priority: 09.10.1998
(33) Krajina priority: DE
(40) Dátum zverejnenia: 12.09.2000
(86) Číslo PCT:

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.7 :

C 12P 7/42
C 12P 13/02
C 12N 1/21

(71) Prihlasovateľ: Degussa-Hüls Aktiengesellschaft, Frankfurt am Main, DE;

(72) Pôvodca vynálezu: Elischewski Frank, Dr., Leopoldshöhe, DE;
Kalinowski Jörn, Dr., Bielefeld, DE;
Pühler Alfred, prof. Dr., Bielefeld, DE;
Dusch Nicole, Dr., Bielefeld, DE;
Dohmen Jürgen, Dr., Meerbusch, DE;
Farwick Mike, Dr., Bielefeld, DE;
Thierbach Georg, Dr., Bielefeld, DE;

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

(54) Názov prihlášky vynálezu: Spôsob výroby kyseliny pantoténovej

(57) Anotácia:

Je opísaný spôsob výroby kyseliny pantoténovej použitím mikroorganizmov so zlepšenou produkčnou schopnosťou zosilnením expresie nukleotidových sekvencií kódujúcich ketopantoátreduktázu, najmä gén panE, prípadne gén ilvC. Ďalej sú opísané mikroorganizmy obsahujúce tieto nukleotidové sekvencie a spôsob výroby kyseliny D-pantoténovej pozostávajúci z fermentácie uvedených mikroorganizmov, koncentrovania kyseliny pantoténovej v médiu alebo v bunkách mikroorganizmov a izolácie kyseliny D-pantoténovej.

01-2190-99-Če

Spôsob výroby kyseliny pantoténovej

Oblasť techniky

Kyselina pantoténová predstavuje komerčne významný vitamín, ktorý sa využíva v kozmetike, medicíne, vo výžive ľudí a zvierat.

Doterajší stav techniky

Kyselina pantoténová sa môže vyrábať chemickou syntézou alebo biotechnicky fermentáciou vhodných mikroorganizmov vo vhodných živných roztokoch. Pri chemickej syntéze je dôležitou zloženinou DL-pantolaktón. Vyrába sa viacstupňovým spôsobom z formaldehydu, izobutyraldehydu a kyanidu. V ďalších krokoch spôsobu sa delí racemická zmes a D-pantolaktón sa kondenzuje s β -alanínom a získa sa kyselina pantoténová.

Výhoda fermentačnej výroby pomocou mikroorganizmov spočíva v priamej tvorbe žiaducej stereoizomérskej D-formy.

Kyselinu pantoténovú môžu v živnom roztoku, ktorý obsahuje glukózu, kyselinu DL-pantoínovú a β -alanín, produkovať rôzne druhy baktérií, ako napríklad *Escherichia coli*, *Arthrobacter ureafaciens*, *Corynebacterium erythrogenes*, *Brevibacterium ammoniagenes* a taktiež kvasinky, ako napríklad *Debaromyces castellii*, ako sa ukazuje v EPA 0 493 060. EPA 0 493 060 ďalej ukazuje, že pri *Escherichia coli* sa amplifikáciou génov biosyntézy kyseliny pantoténovej, ktoré sa nachádzajú na plazmidoch pFV3 a pFV5, v živnom roztoku,

ktorý obsahuje glukózu, kyselinu DL-pantoínovú a β -alanín, zlepšuje tvorbu kyseliny D-pantoténovej.

EPA 0 590 857 a US patent 5,518,906 opisujú mutanty odvodené od kmeňa IF03547 *Escherichia coli*, jako je FV5174, FV525, FV814, FV521, FV221, FV6051 a FV5069, ktoré nesú rezistencie voči rozličným antimetabolitom, ako je kyselina salicylová, kyselina β -ketomaslová, kyselina β -hydroxyasparágová kyselina, O-metyltreonín a kyselina α -ketoizovalérová, a produkujú kyselinu D-pantoténovú v živnom roztoku, ktorý obsahuje glukózu a kyselinu pantoínovú a v živnom roztoku, ktorý obsahuje glukózu a β -alanín. V EPA 0 590 857 a US patente 5,518,906 sa ďalej ukazuje, že po amplifikácii génov biosyntézy kyseliny pantoténovej, ktoré sa nachádzajú na plazmide pFV31, sa vo vyššie uvedených kmeňoch v živnom roztoku obsahujúcom glukózu zlepšuje produkcia kyseliny D-pantoínovej a v živnom roztoku obsahujúcom glukózu a β -alanín sa zlepšuje produkcia kyseliny D-pantoténovej.

Vo WO 97/10340 sa okrem toho ukazuje, že v kmeňoch *Escherichia coli* vytvárajúcich kyselinu pantoténovú sa pomocou zvýšenia aktivity enzýmu syntázy II acetohydroxykyseliny, enzýmu biosyntézy valínu, ďalej zvyšuje produkcia kyseliny pantoténovej.

Vynálezcovia si stanovili za úlohu poskytnúť nové podklady pre zlepšený spôsob výroby kyseliny pantoténovej.

Podstata vynálezu

Vitamín kyselina pantoténová predstavuje komerčne významný produkt, ktorý sa využíva v kozmetike, medicíne, vo výžive ľudí a zvierat. Existuje preto všeobecný záujem o

poskytnutie zlepšených spôsobov výroby kyseliny pantoténovej. Keď sa v nasledujúcom texte uvádza kyselina D-pantoténová, kyselina pantoténová alebo pantotenát, mieni sa tým nielen voľná kyselina, ale aj soli kyseliny pantoténovej, ako napríklad vápenatá, sodná, amónna alebo draselná soľ. Predmetom vynálezu je spôsob výroby a zlepšenie mikroorganizmov produkujúcich kyselinu pantoténovú pomocou zosilnenia, najmä nadmernej expresie nukleotidových sekvencií, najmä génu *panE*, kódujúcich ketopantoátoreduktázu, jednotlivo alebo kombinovane navzájom, a popri prípade doplnkovo génu *ilvC*.

Pojem „zosilnenie“ opisuje v tejto súvislosti zvýšenie intracelulárnej aktivity jedného alebo viacerých enzýmov, ktoré sú kódované príslušnou DNA, tým, že sa zvýši počet kópií génu (génov), použije sa silný promótor alebo sa použije gén, ktorý kóduje príslušný enzým s vysokou špecifickou aktivitou a tieto opatrenia sa kombinujú.

Zistilo sa najmä, že pri nadmernej expresii génu *panE* spolu s génmi *panB*, *panC* a *panD* sa ďalej zlepšuje tvorba kyseliny pantoténovej. Na dosiahnutie nadmernej expresie sa môže počet kópií zodpovedajúcich génov zvýšiť pomocou plazmidových vektorov, ako napríklad pBR322 (Sutcliffe, COLD SPRING HARBOR SYMPOSIA ON QUANTITATIVE BIOLOGY 1979, 43: 77-90) alebo pUC19 (Viera, Gene 1982 19:259-268), alebo sa môže mutovať promótorová a regulačná oblasť, ktorá sa nachádza proti smeru štruktúrneho génu. Známym príkladom toho je mutácia *lac-UV5* promótoru *lac* (Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Nemecko, 1990). Rovnakým spôsobom pôsobia expresívne kazety, ktoré sa zabudujú proti smeru štruktúrneho génu. Táto metóda sa použila napríklad v LaVallie et al., (BIO/TECHNOLOGY 11, 187-193 (1993) a v PCT/US97/13359. Ďalej sa môže alterna-

tívne dosiahnuť nadmerná expresia príslušných génov zmenou zloženia médií a uskutočnenia kultivácie. Príkladom toho je všeobecne známa regulácia expresie operónu lac pomocou glukózy a laktózy. Vynálezcovia okrem toho zistili, že nadmerná expresia génu *panE* sa výhodne prejavuje v kmeňoch, ktoré vykazujú mutácie rezistencie voči metabolitom a antimetabolitom, ako napríklad rezistencie voči L-valínu. Ďalej sa zistilo, že nadmerná expresia génu *panE* sa výhodne prejavuje v kmeňoch, ktoré majú defektné mutácie v génoch metabolických dráh, ako napríklad v géne *avtA* alebo *ilvE*, ktoré premieňajú predstupne kyseliny pantoténovej alebo znižujú tvorbu kyseliny pantoténovej.

Mikroorganizmy, ktoré sú predmetom predloženého vynálezu, môžu produkovať kyselinu pantotenovú z glukózy, sacharózy, laktózy, fruktózy, maltózy, melasy, škrobu, celulózy alebo z glycerolu a etanolu. Pritom sa jedná o plesne, kvasinky alebo najmä grampozitívne baktérie, napríklad rodu *Corynebacterium*, alebo gramnegatívne baktérie, napríklad *Enterobacteriaceae*. Pri čeladi *Enterobacteriaceae* je treba menovať najmä rod *Escherichia* s druhom *Escherichia coli*. V rámci druhu *Escherichia coli* je potrebné uviesť takzvané kmene K-12, ako napríklad kmene MG1655 alebo W3110 (Neidhard et al.: *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology (ASM Press, Washington D. C.)) alebo kmeň *Escherichia coli* divého typu IFO3547 (Inštitút pre fermentáciu, Osaka, Japonsko) a od nich odvodené mutanty. Pri rode *Corynebacterium* možno uviesť najmä druh *Corynebacterium glutamicum*, ktorý je v odbornom svete známy pre svoju schopnosť tvoriť aminokyseliny. K tomuto druhu patria kmene divého typu, napríklad *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Brevibacterium flavum* ATCC14067, *Corynebacterium melassecola* ATCC17965 a iné.

Na izoláciu génu *ilvC* a génu *panE* sa najskôr vytvorí napríklad z *Escherichia coli* mutant, ktorý nesie mutáciu v géne *ilvC* a géne *panE*.

Nukleotidová sekvencia génu *ilvC* *Escherichia coli* je známa (Wek and Hatfield, *Journal of Biological Chemistry* 261, 2441-2450 (1986)). Metódy izolácie chromozomálnej DNA sú taktiež známe (Sambrook et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Voľbou vhodných primerov sa môže gén *ilvC* amplifikovať pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (Innis et al., *PCR protocols. A guide to methods and applications*, 1990, Academic Press). Potom sa vloží do plazmidového vektora. Ako plazmidové vektory prichádzajú do úvahy také, ktoré sa môžu replikovať v príslušných mikroorganizmoch. Pre *Escherichia coli* prichádzajú pre predložený vynález do úvahy napríklad vektory pSC101 (Vocke and Bastia, *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 80 (21), 6557-6561 (1983)) alebo pKK223-3 (Brosius and Holy, *Proceedings of the National Academy of Science USA* 81, 6929 (1984)), pre *Corynebacterium glutamicum* napríklad vektor pJCl (Cremer et al., *Mol. Gen. Genet.* 220:478-480 (1990)) alebo pEKEx2 (Eikmanns et al., *Gene* 102:93-98 (1991)) alebo pZ8-1 (európsky patentový spis 0 375 889) a pre *Saccharomyces cerevisiae* napríklad vektor pBB116 (Berse, *Gene* 25: 109-117 (1983)) alebo pDG1 (Buxton et al., *Gene* 37: 207-214 (1985)). Metódy zabudovania fragmentov DNA do plazmidových vektorov sú opísané v Sambrook et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Metódy transformácie a elektroporácie sú opísané v Tauch et al. (*FEMS Microbiology Letters* 123:343-347 (1994)). Príkladom takého transformovaného kmeňa je kmeň *Escherichia coli* MG1655/pFE32. Plazmid pFE32 obsahuje gén *ilvC* z MG1655,

ktorý sa zabudoval do vektora pBR322. Ďalším príkladom takého transformovaného kmeňa je kmeň ATCC13032/pFE91 *Corynebacterium glutamicum*. Plazmid pFE91 obsahuje gén *ilvC* z ATCC13032, ktorý sa zabudoval do vektora pECm3. Plazmid pECm3 je derivátom plazmidu pECm2 (Tauch, 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-348), ktorého gén rezistencie na kanamycín sa odstránil pomocou restrikcie BglII a BamHI s následnou religáciou.

Na zabudovanie mutácie do génu *ilvC*, ktorá eliminuje jeho funkciu, sa môže do tohto zabudovať napríklad delécia alebo inzercia. Na vytvorenie delécie sa môže pomocou vhodných restrikčných enzýmov a následného naviazania vzniknutých koncov odstrániť vnútorná časť nukleotidovej sekvencie štruktúrneho génu. Týmto spôsobom mutovaný gén *ilvC* je nefunkčný. Rovnakým spôsobom sa môže do génu *ilvC* vložiť druhý gén, aby kódoval rezistenciu na antibiotikum. Týmto spôsobom mutovaný gén *ilvC* je tiež nefunkčný. Takto mutovaný gén *ilvC* sa môže potom vložiť do mikroorganizmu a v jeho chromozóme sa môže vymeniť za gén divého typu. Metódy uskutočnenia tejto génovej výmeny sú známe z literatúry. Pre *Escherichia coli* sa môže použiť metóda opísaná v Hamilton et al. (Journal of Bacteriology 171, 4617-4622 (1989)), ktorá je založená na replikačných mutantoch plazmidu pSC101, citlivých na teplotu. Takým plazmidom je napríklad pMAK705. Pre *Corynebacterium glutamicum* sa môže použiť metóda génovej výmeny opísaná Schwarzerom a Pühlerom (BIO/TECHNOLOGY 9, 84-87 (1991)), pri ktorej sa používajú nereplikatívne plazmidové vektory. Pre *Saccharomyces cerevisiae* je opísaná metóda cielenej génovej výmeny v Rocca et al. (Nucleic Acid Research 20(17), 4671-4672 (1992)).

Mutovaný gén *ilvC* sa môže napríklad takto vytvoriť z génu *ilvC* divého typu. Plazmid pFE32 obsahuje pBR322, do ktorého restričného miesta strihu BamHI bol zabudovaný gén *ilvC* divého typu. Do miesta strihu KpnI génu *ilvC* z pFE32 bol zabudovaný gén *aacC1*, ktorý kóduje rezistenciu na antibiotikum gentamycín (Schweizer, BioTechniques 15 (5), 831-834 (1993)). Týmto spôsobom získaný plazmid pFE33 obsahuje alelu *ilvC::aacC1*, ktorá už nemôže tvoriť žiadny funkčný génový produkt *ilvC*. Alela *ilvC::aacC1* sa odobrala z plazmidu pFE33 a vložila do miesta strihu SphI plazmidu pMAK705, čím vznikol plazmid pDB1. Plazmid pDB1 je plazmidovým vektorom spôsobilým na výmenu alel, ktorý sa skladá po prvé z pMAK705 a po druhé z alely *ilvC::aacC1*. Plazmid pDB1 sa použil podľa metódy opísanej Hamiltonom et al., aby sa vymenil gén *ilvC* divého typu nachádzajúci sa v MG1655 za alelu *ilvC::aacC1*. Týmto spôsobom vzniknutý kmeň sa označuje ako FE4.

Na izoláciu mutantu FE4, ktorý nesie mutáciu v géne *panE*, sa kmeň FE4 podrobil transpozónovej mutagenéze s transpozónom Tn5. Transpozón Tn5 je opísaný v Auerswald (COLD SPRING HARBOR SYMPOSIA ON QUANTITATIVE BIOLOGY 45, 107-113 (1981)). Metóda transpozónovej mutagenézy je opísaná napríklad v príručke od Millera, A: Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992). Metóda je ďalej opísaná v Simon (Gene, 80, 161-169 (1998)) a aj v príručke od Hagemanna: Gentechnologische Arbeitsmethoden (Gustav Fischer Verlag, 1990) a v početných iných publikáciách prístupných verejnosti. Mutanty sa môžu ďalej vytvárať po mutagenéze ultrafialovým svetlom alebo po spracovaní chemikáliou vyvolávajúcou mutáciu, ako napríklad N-metyl-N'-nitro-N-nitrozoguanidín. Medzi mutantami

mi získanými týmto spôsobom sa môžu po skúške potreby rastových látok, najmä potreby kyseliny pantoténovej, izolovať také mutanty, ktoré nesú mutáciu v géne biosyntézy kyseliny pantoténovej. Zvláštny záujem je o také mutanty, potrebujúce kyselinu pantoténovú, ktoré nemôžu zhodnocovať ako rastovú látku ketopantoát, ale pantoát, a teda sú mutované v géne *panE* kódujúcom ketopantoátreduktázu (EC 1.1.1169). Príkladom toho je takto získaný kmeň FE5, ktorý okrem mutácie *ilv::aacC1* nesie mutáciu *panE::Tn5*.

Mikroorganizmy, ktoré nesú defektnú mutáciu v géne *ilvC* a *panE*, ako napríklad kmeň FE5 *Escherichia coli*, sa môžu použiť ako hostitelia na klonovanie na izoláciu génu *ilvC* a obzvlášť zaujímavého génu *panE* alebo nukleotidových sekvencií, ktoré kódujú proteíny s ketopantoátreduktázovou aktivitou.

Na to sa založí génová banka záujem pútajúceho mikroorganizmu. Založenie génových bánk je opísané vo všeobecne známych učebniciach a príručkách. Ako príklad možno uviesť učebnicu od Winnackera: *Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie* (Verlag Chemie, Weinheim, Nemecko, 1990) alebo príručku od Sambrooka et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Známu génovou bankou je banka kmeňa W13110 *E. coli* K-12, ktorú založili Kohara et al. (*Cell* 50, 495 - 508 (1987)). Génové banky rôznych mikroorganizmov sa môžu zatiaľ získať zakúpením, ako napríklad génová banka kmeňa Sp63 *Saccharomyces pombe* od firmy Stratagene (Heidelberg, Nemecko) v plazmide Lambda FIX II (Elgin, *Strategies* 4: 6-7 (1991)), génová banka kmeňa W1485 *Escherichia coli* od firmy CLONTECH (Heidelberg, Nemecko) v plazmide pGAD10 (Kitts, CLONTECH (Heidelberg, Nemecko) *Vectors On Disc version 1.3*,

1994), ktorého nukleotidová sekvencia je prístupná pod Gen-Bank accession number (prírastkovým číslom génovej banky) U13188. Génová banka vyrobená vyššie opísaným spôsobom sa potom môže pomocou transformácie zaviesť do vyššie opísaného hostiteľa FE5. Takto sa napríklad pGAD10 - génová banka W1485 zaviedla do kmeňa FE5 pomocou transformácie a získané transformanty sa preskúšali na svoju schopnosť rásť na živnej pôde bez kyseliny pantoténovej. Inzercie obsiahnuté v plazmidovej DNA získaných transformantov prototrofných voči kyseline pantoténovej sa môžu preskúmať pomocou určenia nukleotidovej sekvencie. Metódy určovania nukleotidových sekvencií sa môžu prečítať napríklad v Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Science USA 74:5463-5467 (1977)). Nukleotidové sekvencie sa môžu priradiť génom pomocou skúmania homológie. Jedna z možností na toto vyhľadávanie homológie ponúka porovnanie s nukleotidovými sekvenciami báz dát EMBL a génovej banky, ktoré sa môžu uskutočniť prostredníctvom BLAST E-mail Service (Altschul, Journal of Molecular Biology 215, 403-410 (1990)). Príkladom takého transformantu je kmeň FE5/pFEbank16 *Escherichia coli*, ktorý nesie gén panE kmeňa MG1655 *E. coli*.

Gén panE izolovaný a identifikovaný opísaným spôsobom sa môže potom v žiaducom mikroorganizme priviesť k expresii. Na to sa amplifikuje pomocou plazmidových vektorov. Tieto zasa môžu byť vybavené signálovými štruktúrami, ktoré zaisťujú účinnú transkripciu a transláciu. Prehľad expresívnych vektorov sa nachádza napríklad v učebnici od Winnackera: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Nemecko, 1990) alebo v Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Ďalej sa môžu expresívne signály, ako napríklad promótor tac, vložiť do chromozómu

proti smeru génu panE. Také metódy sú opísané vo WO 98/04715. Gén panE, ktorý sa má exprimovať, sa môže prevziať z klonovaného fragmentu chormozómovej DNA alebo sa môže amplifikovať zasa pomocou polymerázovej reťazovej reakcie. Množstvo ketopantoátreduktázy nachádzajúcej sa v príslušnom mikroorganizme sa môže stanoviť pomocou metódy opísanej v Shimizu et al. (Journal of Biological Chemistry 263: 12077-12084 (1988)). Príkladom takého kmeňa je kmeň MG1655/pFE65 *Escherichia coli*. Plazmid pFE65 sa skladá z vektora pKK223-3, do ktorého restriktčného miesta strihu EcoRI sa vložil gén panE *Escherichia coli* MG1655.

Podľa vynálezu sa prejavilo ako výhodné dodatočne ku génu panE kódujúcemu ketopantoátreduktázu zosilniť, najmä nadmerne exprimovať jeden alebo viac génov biosyntézy kyseliny pantoténovej. K tomu patria gény, ktoré kódujú enzýmy ketopantoát-hydroxymetyltransferázu (EC 4.1.2.12), aspartát-1-dekarboxylázu (EC 4.1.1.11) a pantotenátsyntetázu (EC 6.3.2.1). V *Escherichia coli* nesú tieto gény označenie panB, panD a pan C (Miller, A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)). Na to sa gény môžu zabudovať do rôznych kompatibilných plazmidových vektorov. Príklady na to sú opísané v Bartolome et al. (Gene 102, 75-78 (1991)). Expresia génov sa môže ďalej zvýšiť zmenou proti smeru uložených chromozómových signálových štruktúr. Ďalej sa príslušné gény môžu usporiadať navzájom za sebou za kontroly spoločného promotóra a zabudovať do plazmidového vektora a zaviesť do vhodného mikroorganizmu. Príkladom k tomu je kmeň MG1655/pFE80 *Escherichia coli*. Plazmid pFE80 sa skladá z plazmidu pKK223-3, ktorý obsahuje gény panB, panD, panC a panE v uvedenom

poradí. Proti smeru génu panB sa nachádza v pFE80 promótor tac ako expresívny signál.

Ďalej sa ako výhodné ukázalo nadmerne exprimovať gén panE a expresívnu jednotku skladajúcu sa z génov panB, panD, panC a panE v hostiteľských kmeňoch, ktoré obsahujú chromozómové mutácie.

Môžu sa použiť jednotlivito alebo spoločne mutácie, ktoré spôsobujú rezistenciu voči produktom metabolizmu, ako napríklad L-valínu alebo kyseliny β -ketoizovalerovej, alebo voči analógom produktov metabolizmu, ako napríklad kyseliny β -hydroxyasparágovej alebo O-metyltreonínu. Také mutanty sa vyskytujú spontánne alebo sa môžu vytvárať po mutagenéze ultrafialovým svetlom alebo po spracovaní s chemikáliou vyvolávajúcou mutáciu, ako napríklad N-metyl-N'-nitro-N-nitrozoguanidín, a potom selektovať na agarových platniach, ktoré obsahujú príslušnú látku. Spôsoby vyvolania mutácie a selekcie sú všeobecne známe a môžu sa medzi iným prečítať v Miller (A. Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)) alebo v príručke „Manual of Methods for General Bacteriology“ od American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981). Ako príklad pre také mutanty je kmeň FE6 *Escherichia coli*, ktorý sa izoloval ako spontánne sa vyskytujúci, na L-valín rezistentný mutant kmeňa MG1655.

Ďalej sa môžu cielene vylúčiť nepriaznivé alebo rušivé chromozómovo kódované metabolické reakcie. Na to sa do príslušných génov vložia inzercie alebo delécie a takto vzniknuté mutované gény, popri prípade alely sa zabudujú do chromozómu príslušného hostiteľa. Môžu sa použiť metódy, ktoré

boli opísané vyššie pre mutáciu génu *ilvC*. Príkladom takých mutantov je kmeň FE7 *Escherichia coli*, ktorý nesie mutáciu *avtA::aadB* v chromozóme. Pritom sa jedná o kmeň MG1655, do ktorého génu *avtA* sa vložil gén *aadB* z plazmidu pHP45 Ω , sprostredkujúci rezistenciu na streptomycín (Prentki a Krisch, Gene 29, 303-313 (1984)). V hostiteľských kmeňoch vytvorených týmto spôsobom sa môže nadmerne exprimovať gén *panE* samotný alebo v kombinácii s inými génmi. Príkladmi k tomu sú kmene FE6/pFE80 a FE7/pFE80.

Mikroorganizmy vytvorené podľa vynálezu sa môžu kultivovať na účely produkcie kyseliny pantoténovej kontinuálne alebo diskontinuálne spôsobom batch alebo spôsobom fed batch (prítokový systém) alebo spôsobom repeated fed batch (opakovaný prítokový systém). Zhrnutie známych kultivačných metód sa opisuje v učebnici od Chmiela (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) alebo v učebnici od Storhasa (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Viewegh Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)). Kultivačné médium, ktoré sa má použiť, musí vhodným spôsobom vyhovovať nárokom daných mikroorganizmov. Opisy kultivačných médií rôznych mikroorganizmov sa nachádzajú v príručke „Manual of Methods for General Bacteriology“ od American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981). Ako zdroje uhlíka sa môžu použiť cukry a sacharidy, ako je napríklad glukóza, sacharóza, laktóza, fruktóza, maltóza, melasa, škrob a celulóza; oleje a tuky, ako napríklad sójový olej, slnečnicový olej, podzemnicový olej a kokosový olej, mastné kyseliny, ako je kyselina palmitová, kyselina stearová, kyselina linolová; alkoholy, ako je napríklad glycerol a etanol; a organické kyseliny, ako je napríklad kyselina octová. Tieto látky sa môžu používať ako jednotlivé zložky alebo ako zmes. Ako zdroje dusíka sa môžu

používať organické zlúčeniny obsahujúce dusík, napríklad peptóny, kvasnicový extrakt, mäsový extrakt, sladový extrakt, máčacia voda, sójová múka a močovina, alebo anorganické zlúčeniny, ako je napríklad síran amónny, chlorid amónny, fosforečnan amónny, uhličitan amónny a dusičnan amónny. Zdroje dusíka sa môžu používať jednotlivo alebo ako zmes. Ako zdroje fosforu sa môžu používať kyselina fosforečná, dihydrogenfosforečnan draselný alebo hydrogenfosforečnan draselný alebo príslušné soli obsahujúce sodík. Kultivačné médium musí ďalej obsahovať soli kovov, ako napríklad síran horečnatý alebo síran železa, ktoré sú potrebné pre rast. Napokon sa môžu dodatočne k vyššie uvedeným látkam používať esenciálne rastové látky, ako sú aminokyseliny a vitamíny. Ku kultivačnému médiu sa môžu okrem toho pridávať vhodné prekurzory kyseliny pantoténovej, ako napríklad β -alanín alebo kyselina ketopantoínová a ich soli. Uvedené dávky sa môžu ku kultúre pridávať vo forme jednorazovej vsádzky alebo sa môžu vhodným spôsobom pridávať počas kultivácie.

Na kontrolu pH kultúry sa vhodne používajú zásadité zlúčeniny, ako je hydroxid sodný, hydroxid draselný, amoniak, alebo kyslé zlúčeniny, ako je kyselina fosforečná alebo kyselina sírová. Na kontrolu tvorby peny sa môžu používať odpeňovadlá, ako napríklad polyglykolestery mastných kyselín alebo silikónové oleje. Na udržiavanie stability plazmidov sa môžu k médiu pridávať vhodné selektívne pôsoiace látky, napríklad antibiotiká. Aby sa udržiavali aeróbne podmienky, zavádza sa do kultúry kyslík alebo zmesi obsahujúce kyslík, napríklad vzduch. Teplota kultúry je obvykle približne 20 °C až 45 °C a najmä približne 25 °C až 40 °C. Kultúra sa udržiava tak dlho, kým sa nevytvorí

maximum kyseliny pantoténovej. Tento cieľ sa obvykle dosiahne za 10 hodín až 160 hodín.

Koncentrácia vytvorenej kyseliny pantoténovej sa môže stanoviť pomocou známych spôsobov (Velisek; Chromatografic Scinece 60, 515-560 (1992)).

Nasledujúce mikroorganizmy sa uložili v Nemeckej zbierke mikroorganizmov a bunkových kultúr (DSMZ, Braunschweig, Nemecko) podľa budapeštianskej zmluvy:

Escherichia coli K12 kmeň FE5 ako DSM12378,

Escherichia coli K12 kmeň MG1655/pFE32 ako DSM12413,

Escherichia coli K12 kmeň MG1655/pFE65 ako DSM12382,

Escherichia coli K12 kmeň MG1655/pFE80 ako DSM12414,

Escherichia coli K12 kmeň FE6 ako DSM12379,

Escherichia coli K12 kmeň FE7 ako DSM12380.

Pomocou spôsobu podľa vynálezu sa odborníkovi poskytuje nový nástroj na docielenie zlepšenia tvorby kyseliny pantoténovej mikroorganizmov.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Priložené sú nasledovné obrázky:

Obrázok 1: Mapa plazmidu pDB1

Obrázok 2: Mapa plazmidu pGAD10

Obrázok 3: Mapa plazmidu pFEbank16

Obrázok 4: Mapa plazmidu pFE32

Obrázok 5: Mapa plazmidu pFE65

Obrázok 6: Mapa plazmidu pFE80

Obrázok 7: Mapa plazmidu pFE91

Obrázok 8: Mapa plazmidu pJDCEX2

Obrázok 9: Mapa plazmidu pJD-YHR063c.

Pri údajoch počtu párov báz sa jedná o približné hodnoty, ktoré sa získajú v rámci reprodukovateľnosti.

Skratky použité na obrázkoch majú nasledovný význam:

rrnBT1T2: Transkripčný terminátor génu rrnB

Ptac: tac-promótor

P ADH1: promótor génu ADH1 zo *Saccharomyces cerevisiae*

T ADH1: terminátor génu ADH1 zo *Saccharomyces cerevisiae*

repts: termosenzitívny začiatok replikácie

ilvC: kódujúca oblasť génu ilvC

ilvC': 5'-oblasť génu ilvC

'ilvc: 3'-oblasť génu ilvC

panB: kódujúca oblasť génu panB

panC: kódujúca oblasť génu panC

panD: kódujúca oblasť génu panD

panE: kódujúca oblasť génu panE

Amp: gén rezistencie na ampicilín

tet': 5'-oblasť génu tet

'tet: 3'-oblasť génu tet

Cm: gén rezistencie na chloramfenikol

- Gm: gén rezistencie na gentamycín
- Gal4: regulátor pre gény indukovateľné galaktózu zo *Saccharomyces cerevisiae*
- bps: páry báz
- LEU2: gén beta-izopropylmalátdehydrogenázy zo *Saccharomyces cerevisiae*
- 2 μ : sekvencie endogénneho plazmidu 2 μ zo *Saccharomyces cerevisiae*
- Ap^R: gén beta-laktamázy
- P-CUP1: promótor génu CUP1 *Saccharomyces cerevisiae* (metalotioneín)
- T-CYC1: terminátor génu CYC1 (cytochróm C) *Saccharomyces cerevisiae*
- ORF: open reading frame (otvorený čítací rámec)
- SD: Shineho-Dalgarnova sekvencia
- EcoRI: miesto strihu restriktčného enzýmu EcoRI
- EcoRV: miesto strihu restriktčného enzýmu EcoRV
- HincII: miesto strihu restriktčného enzýmu HincII
- HindIII: miesto strihu restriktčného enzýmu HindIII

- KpnI: miesto strihu restričného enzýmu KpnI
- SalI: miesto strihu restričného enzýmu SalI
- SmaI: miesto strihu restričného enzýmu SmaI
- SphI: miesto strihu restričného enzýmu SphI
- PvuII: miesto strihu restričného enzýmu PvuII
- NotI: miesto strihu restričného enzýmu NotI
z *Norcardia otitidis-cavarium*
- SpeI: miesto strihu restričného enzýmu SpeI zo
Shpaerotilus spec.
- XbaI: miesto strihu restričného enzýmu XbaI
z *Xanthomonas badrii*
- PstI: miesto strihu restričného enzýmu PstI
z *Providencia stuartii*

Príklady uskutočnenia úspechu

Príklad 1

Produkcia mutantu *ilvC::aacC1 panE::Tn5* kmeňa MG1655
Escherichia coli K12

1. Produkcia mutantu *ilvC::aacC1*

Vychádzajúc z nukleotidovej sekvencie pre gén *ilvC* v *E. coli* K12 MG1655, (EMBL-GenBank: Prírastkové č. M87049) sa syntetizovali primery PCR (MWG Biotech (Ebersberg, Nemecko)). Fragment DNA s veľkosťou približne 1500 kb sa mohol amplifikovať pomocou týchto primerov za štandardnej metódy PCR od Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press). Chromozómová DNA *E. coli* K12 MG1655 použitá na PCR sa izolovala pomocou kitu NucleoSpin C + T (Macherey-Nagel (Düren, Nemecko), opis produktu NucleoSpin C + T, Art.-Nr. 740952). Veľkosť sa stanovila pomocou gélovo-elektroforetického delenia (30 minút, 10 V/cm) v 0,8% agarózovom géli.

Primer PCR pre gén *ilvC* z *E. coli*:

ilvC1 5'-AGAAGCACAACATCACGAGG -3'

ilvC2 5'-CTCCAGGAGAAGGCTTGAGT -3'

Produkt PCR génu *ilvC* se transformoval do plazmidu pCR[®]2.1 a do kmeňa TOP10F' *E. coli* K12 (Invitrogen (Leek, Holandsko), opis produktu Original TA Cloning[®] Kit, Cat. no. KNM2030-01).

Úspech klonovania sa dokázal štiepením DNA plazmidu pCR[®]2.1:*ilvC* restriktčnými enzýmami EagI (Pharmacia Biotech

(Freiburg, Nemecko), opis produktu EagI, Code no. 27-0885-01) EcoRI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Nemecko), EcoRI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Nemecko), opis produktu EcoRI, Code no. 27-0884-03) a KpnI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Nemecko), opis produktu KpnI, Code no. 27-0908-01). Na to sa izolovala plazmidová DNA pomocou kitu QIAprep Spin Plasmid (QIAGEN (Hilden, Nemecko), Cat. No. 27106) a po štiepení v 0,8% agarózovom géli (30 minút, 10V/cm) sa delila.

Na izoláciu génu *ilvC* z plazmidu pCR[®]2.1ilvC sa izolovala plazmidová DNA štiepila enzýmami HindIII (Pharmacia Biotech (Freiburg, Nemecko), opis produktu HindIII, Code no. 27-0860-01) a XbaI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Nemecko), opis produktu XbaI, Code no. 27-0948-01), štiepna násada sa delila v 0,8% agarózovom géli (30 minút, 10 V/cm) a fragment *ilvC* 1,5 kbp sa izoloval pomocou kitu GLASSMAX[™] (GIBCO BRL (Eggenstein, Nemecko), opis produktu GLASSMAX[™] Spin Cartridges, Cat. No. 15590-052). Izolovaný fragment *ilvC* sa ligoval s plazmidom pMAK705 taktiež štiepeným HindIII a XbaI (Hamilton et al., Journal of Bacteriology 1989, 171:4617-4622) pomocou T4-DNA-ligázy (Pharmacia Biotech (Freiburg, Nemecko), opis produktu T4-DNA-ligáza, Code no. 27-0870-03) a kmeň DH5 α mcrcr (Grant, Proceedings of the National Academy of Science 1990, 87: 4645-4649) sa elektroporoval s ligačnou násadou (Tauch, FEMS Microbiology Letters 1994, 123: 343-347). Selekcia buniek nesúcich plazmid sa uskutočňovala rozostretím elektroporačnej násady na agar LB (Lennox, Virology 1955, 1: 190), ktorý bol zmiešaný s 25 μ g/ml chloramfenikolu (Sigma (Deisenhofen, Nemecko), (Deisenhofen, Nemecko), Code no. C 0378), a inkubáciou 24 hodín pri 30 °C. Hľadaný plazmid sa mohol po izolácii DNA a kontrolnom štiepení, pri následnej gélovej elektroforéze v 0,8% agarózovom géli

(30 minút, 10 V/cm), enzýmami HindIII, XbaI a KpnI identifikovať v jednom klone a označil sa ako pFE30.

Na izoláciu génu *ilvC* z plazmidu pFE30 sa izolovaná plazmidová DNA štiepila enzýmom BamHI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Nemecko), opis produktu BamHI, Code no. 27-0868-03), štiepna násada sa delila v 0,8% agarózovom géli (30 minút, 10 V/cm) a fragment *ilvC* 1,5 kbp sa izoloval pomocou kitu GLASSMAX™. Izolovaný fragment *ilvC* sa ligoval pomocou T4-DNA-ligázy s plazmidom pBR322 taktiež štiepeným BamHI (Sutcliffe, COLD SPRING HARBOR ON QUANTITATIVE BIOLOGY 1979, 43: 77-90) a kmeň DH5 α mcrcr sa elektroporoval s ligačnou násadou. Selekcia buniek nesúcich plazmid sa uskutočňovala rozostretím elektroporačnej násady na agar LB, ktorý bol zmiešaný so 100 μ g/ml ampicilínu (Sigma (Deisenhofen, Nemecko), Code no. A 9518), a inkubáciou 24 hodín pri 37 °C. Získané kolónie sa paralelne naočkovali na agar LB+ampicilín a LB + (5 μ g/ml) tetracyklínu (Sigma (Deisenhofen, Nemecko), Code no. T3383). DNA z kolónií senzitívnych na tetracyklín sa izolovala pomocou kitu QIAprep Spin Plasmid a úspech klonovania sa overoval štiepením pomocou BamHI a KpnI a následným delením v 0,8% agarózovom géli (30 minút, 10 V/cm). Skonstruovaný plazmid sa nazval pFE32.

Do miesta strihu KpnI plazmidu pFE32 sa klonoval gén *aacC1* a získaný plazmid a označil pFE33. Gén *aacC1* sa na to izoloval z agarózového gélu (30 minút, 10 V/cm), v ktorom sa delila KpnI-restrikčná násada plazmidu pMS255 (Becker, Gene 1995, 162: 37-39). Ligácia sa uskutočňovala pomocou T4-DNA-ligázy. Po elektroporácii ligačnej násady do kmeňa DH5 α mcrcr sa transformanty selektovali na agare PA (Sambrook, Molecular cloning, 2nd edn, Cold Spring Harbor, 1989), ktorý bol zmiešaný s 10 μ g/ml gentamycínu (Sigma (Deisenhofen, Nemecko),

Code no. G3632). DNA z kolónií rezistentných na gentamycín sa izolovala pomocou kitu QIAprep Spin Plasmid a úspech klonovania sa overoval štiepením pomocou BamHI a KpnI a následným delením v 0,8% agarózovom géli (30 minút, 10 V/cm).

Fragment *ilvC:aacC1* sa vyštípil z plazmidu pFE33 restrikciou SphI-(Pharmacia Biotech (Freiburg, Nemecko), opis produktu SphI, Code no. 27-0951-01), delil v 0,8% agarózovom géli (30 minút, 10 V/cm) a izoloval pomocou kitu GLASSMAX™. Fragment sa ligoval s plazmidom pMAK705, štiepeným SphI, pomocou T4-DNA-ligázy, ligačná násada sa elektroporovala kmeňa DH5 α mc r a transformanty sa selektovali pomocou inkubácie na agare PA+gentamycín 24 hodín pri 30 °C. DNA z kolónií rezistentných na gentamycín sa izolovala pomocou kitu QIAprep Spin Plasmid a úspech klonovania sa dokázal štiepením pomocou SphI a EcoRI v 0,8% agarózovom géli (30 minút, 10 V/cm). Skonstruovaný plazmid sa nazval pDB1.

Pomocou plazmidu pDB1 sa v kmeni *E. coli* K12 MG1655 vymenil chromozomálny gén *ilvC* za prerušený fragment *ilvC:aacC1*. Na génovú výmenu sa použila modifikovaná metóda podľa Hamiltona et al. Plazmid pDB1 sa elektroporoval do kmeňa *E. coli* K12 MG1655 a potom sa na selekciu kointegrátov inkubovali transformanty 24 hodín pri 42 °C na LB-chloramfenikolovom agare. Získané kolónie sa na rozjednocovanie znova inkubovali nanesené na rovnakom médiu 24 hodín pri 42 °C. Na dezintegráciu plazmidu sa jednotlivé kolónie inkubovali v 5 ml kvapalného média LB 24 hodín pri 42 °C a potom sa rozostrel zriedovacie rad kvapalného média na agar LB-chloramfenikol. Tento zriedovacie rad sa inkuboval 24 hodín pri 30 °C. Na ošetrovanie plazmidu sa jednotlivé kolónie získané zo zriedovacieho radu sa naniesli v 3 za sebou nasledujúcich náteroch jednotlivých kolónií na agar LB vždy na 24 hodín pri 42

°C. Na kontrolu fenotypu sa získané jednotlivé kolónie paralelne naočkovali na agarové platne s nasledujúcimi médiami: médium E (Vogel, Journal of Biological Chemistry 1956, 218: 97-106) + glukóza (0,4%), médium E + glukóza (0,4%) (Sigma (Deisenhofen, Nemecko), Code no. G8270) + 50 µg/ml izoleucínu (Sigma (Deisenhofen, Nemecko), Code no. I7268), médium E + glukóza (0,4%) + 50 µg ketoizovalerátu (ICN (Eschwege, Nemecko), Code no. 151395), médium E + glukóza (0,4%) + 50 µg/ml izoleucínu + 50 µg ketoizovalerátu, médium PA + gentamycín + médium LB + chloramfenikol. Tieto médiá sa inkubovali 48 hodín pri 37 °C. Medzi 150 testovanými jednotlivými kolóniami sa nachádzala jedna, ktorej fenotyp indikoval výmenu chromozomálneho génu *ilvC* za fragment *ilvC::aacC1*. Tento kmeň sa označil ako FE4.

2. Produkcia dvojnásobného mutantu *ilvC::aacC1 panE::Tn5*

Kmeň FE4 sa naniesol do 5 ml kvapalného média LB + 10mM MgSO₄ + 0,2% maltózy (Sigma (Deisenhofen, Nemecko), Code no. M5885) (LBMgMal) pri 37 °C na optickú hustotu 0,5. Meranie optickej hustoty sa uskutočnilo fotometrom Novaspec II Pharmacia (Freiburg, Nemecko) pri vlnovej dĺžke 660 nm. 2 ml roztoku baktérií sa odstredovalo 5 min pri 3000 ot./min (centrifúga Beckmann model J2-21, rotor JA-17). Po extrakcii pelety pomocou 0,5 ml kvapalného média LBMgMal sa suspenzia zmiešala s 30 µl lyzátu $\lambda::Tn5$ (Simon, Gene 1989, 80(1):161-169), približne 10⁸ bakteriofágov. Tento lyzát sa izoloval z kmeňa *E. coli* K12 C600 (Appleyard, Genetics 1954, 39:440-452), podľa Hagemannovej metódy (Gentechnologische Arbeitsmethoden, Gustav Fischer Verlag, 1990: 14-18). Suspenzia s lyzátom $\lambda::Tn5$ sa inkubovala 45 minút pri 30 °C. Po odstredovaní 5 minút pri 3000 ot./min sa peleta extrahovala do 10 ml PA + 10mM pyrofosfátu a inkubovala 3 hodiny pri 37 °C.

Roztok baktérií sa rozostrel ako zriedovací rad na médium E-agar + glukóza (0,4%) + 25 µg/ml kanamycínu + 50 µg/ml izoleucínu + 50 µg/ml ketoizovalerátu + 50 µg/ml pantotenátu a inkuboval 48 hodín pri 37 °C. Jednotlivé kolónie sa paralelne naočkovali na médium E-agar + glukóza (0,4%) + 25 µg/ml kanamycínu + 50 µg/ml izoleucínu + 50 µg/ml ketoizovalerátu + 50 µg/ml pantotenátu a na médium agarE + glukóza (0,4 %) + 25 µg/ml kanamycínu + 50 µg/ml izoleucínu + 50 µg/ml ketoizovalerátu a 48 inkubovali pri 37 °C. Medzi 14000 naočkovanými jednotlivými kolóniami sa mohla identifikovať jedna kolónia, označená ako FE5, ktorá rástla na médiu E-agar + glukóza (0,4%) + 25 µg/ml kanamycínu + 50 µg/ml izoleucínu + 50 µg/ml ketoizovalerátu + 50 µg/ml pantotenátu, nie však na médiu E-agar + glukóza (0,4%) + 25 µg/ml kanamycínu + 50 µg/ml izoleucínu + 50 µg/ml ketoizovalerátu.

3. Charakterizácia kmeňov FE4 a FE5

Spolu s kmeňmi *E. coli* SJ2 (Jakowski, Genetic Stock Center, Yale University), ktorý nesie mutáciu v géne panB, MW6 (Williams, Genetic Stock Center, Yale University), ktorý nesie mutáciu v géne panC, a DV9 (Vallari, Journal of Bacteriology 1985, 164:136-142), ktorý nesie mutáciu v géne panD, jako aj s divým typom sa kmene FE4 a FE5 naniesli na rôzne doplnené základné médiá (médiá E-agar + glukóza (0,4%) + 50 µg/ml izoleucínu + 50 µg/ml ketoizovalerátu; pri SJ2, DV9 a MW6 prídavne 50 µg/ml tiamínu) a inkubovali 48 hodín pri 37 °C. Ako prídavné suplementy sa použili pantotenát (vápenatá soľ), ketopantoát (sodná soľ), β-alanín (Sigma (Deisenhofen, Nemecko), Code no. A7752) a pantoát (draselná soľ). Ketopantoát sa pripravil z ketopantolaktónu reakciou s ekvimolovými

množstvami NaOH pri 60 °C a následným odparením. Ketopantolaktón sa syntetizoval podľa Ojima et al. (Organic Synthesis 63, 18 (1985)). Pantoát sa pripravil z pantoyllaktónu (Sigma (Deisenhofen, Nemecko), Code no. P2625) podľa metódy od Primerana a Burnsa (Journal of Bacteriology 1983, 153: 259-269). Výsledok testu rastu (tabuľka 1) ukázal, že kmeň FE4 rástol na všetkých rozlične doplnených základných médiách. Kmeň FE5 rástol len na médiách, ktoré boli doplnené buď pantoténátom, alebo pantoátom, nie však na základných médiách, ktoré boli zmiešané s ketopantoátom.

Tabuľka 1

| Kmeň | Suplementy základného média | | | |
|--------|---|--------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| | Žiadny β -Alanín [50 μ g/ml] | Ketopantoát [50 μ g/ml] | Pantoát [50 μ g/ml] | Pantoténát [50 μ g/ml] |
| MG1655 | + | + | + | + |
| SJ2 | - | - | + | + |
| MW6 | - | - | - | + |
| DV9 | - | + | - | + |
| FE4 | + | + | + | + |
| FE5 | - | - | - | + |

+ = rast

- = žiadny rast

Príklad 2

Izolácia génu *panE* *Escherichia coli* K12 kmeňa W1485

Do kmeňa FE5 sa elektroporovala genómová knižnica (Genomic Library) *E. coli* K12 W1485 MATCHMAKER (CLONTECH (Heidelberg, Nemecko), Cat. no XL4001AB). Genómová knižnica (Genomic Library) *E. coli* K12 MATCHMAKER obsahuje chromozómovú DNA *E. coli* K12 W1485 ako inzerty s priemernou veľkosťou 1,0 kbp v plazmide pGAD10, veľkosť jednotlivých inzertov sa pritom mení od 0,5 do 3,0 kbp (CLONTECH (Heidelberg, Nemecko)). Selekcia transformantov sa uskutočnila rozostretím na médium E-agar + glukóza (0,4%) + 100 µg/ml ampicilínu + 50 µg/ml izoleucínu + 50 µg/ml ketoizovalerátu. Z 20 získaných kolónií sa pomocou kitu QIAprep Spin Plasmid izolovala plazmidová DNA. Štiepením plazmidovej DNA pomocou EcoRI a následným delením v 0,8% agarózovom géli (30 minút, 10 V/cm) sa ukázalo, že pri plazmidoch sa jednalo o 20 vektorov pGAD10 s rozdielne veľkými inzertmi. Sekvencovanie (IIT Biotech (Bielefeld, Nemecko)) inzertov ukázalo porovnaním homológie pomocou programu BLAST (Altschul, Journal of Molecular Biology 1990, 215: 403-410), že inzerty obsahovali v 7 prípadoch úplný gén *ilvC* a v 13 prípadoch otvorený čítací raster, ktorý bol označený ako „podobný *Salmonella typhimurium* *apbA*“ (EMBL-GenBank: prírastkové číslo U82664). Tento otvorený čítací raster sa ako označil *panE*.

Príklad 3

Nadmerná expresia génu *ilvC* *E. coli* v kmeni *E. coli* K12 MG1655

Na nadmernú expresiu génu *ilvC* sa použil plazmid pFE32 (viď príklad 1). Kódujúca oblasť génu *ilvC* je v plazmide pFE32 pod kontrolou promotora tet kódovaného plazmidom pBR322. Plazmid pFE32 sa elektroporoval do kmeňa *E. coli* K12 MG1655 a transformanty sa po následnej inkubácii počas 24 hodín pri 37 °C selektovali na agare LB, ktorý bol zmiešaný so 100 µg/ml ampicilínu. Získaný kmeň sa označil ako MG1655/pFE32.

Príklad 4

Nadmerná expresia génu *panE* *E. coli* v kmeni MG1655 *E. coli* K12

Vychádzajúc z nukleotidovej sekvencie pre gén *panE* v *E. coli* K12 MG1655 sa syntetizovali primery PCR (MWG Biotech (Ebersberg, Nemecko)). Fragment DNA s veľkosťou približne 1000 bp sa mohol amplifikovať pomocou týchto primerov za štandardnej metódy PCR z chromozómovej DNA *E. coli* K12 MG1655. Chromozómová DNA *E. coli* K12 MG1655 použitá na PCR sa izolovala pomocou kitu NucleoSpin C + T. Veľkosť sa stanovila delením gélovou elektroforézou (30 minút, 10 V/cm) v 0,8% agarózovom géli.

Primer PCR pre gén *panE* z *E. coli*:

panE1 5'- AGGAGGACAATGAAAATTAC -3'

panE2 5'-TCAGTCTCTTCACTACCAGG -3'

Produkt PCR génu *panE* sa transformoval do plazmidu pCR[®]2.1 a do kmeňa *E. coli* TOP10F' (Invitrogen (Leek, Holandsko), opis produktu Original TA Cloning[®] Kit, Cat. no.

KNM2030-01). Úspech klonovania sa dokázal štiepením DNA plazmidu pCR[®]2.1panE restriktčnými enzýmami EcoRI a HincII (Pharmacia Biotech (Freiburg, Nemecko), opis produktu HincII, Code no. 27-0858-01). Na to sa izolovala plazmidová DNA pomocou kitu QIAprep Spin Plasmid a po štiepení v 0,8% agarózovom géli (30 minút, 10 V/cm) sa delila.

Na izoláciu génu panE z plazmidu pCR[®]2.1panE sa izolovaná plazmidová DNA štiepila enzýmom EcoRI, štiepna násada sa delila v 0,8% agarózovom géli (30 minút, 10 V/cm) a fragment panE 1,0 kbp sa izoloval pomocou kitu GLASSMAX[™]. Izolovaný fragment panE sa ligoval s plazmidom pKK223-3, taktiež štiepeným EcoRI, pomocou T4-DNA-ligázy a kmeň *E. coli* DH5 α mcrc sa elektroporoval s ligačnou násadou. Selekcia buniek nesúcich plazmid sa uskutočňovala rozostretím elektroporačnej násady na agar LB, ktorý bol zmiešaný so 100 μ g/ml ampicilínu a následnou inkubáciou 24 hodín pri 37 °C. Hľadaný plazmid sa mohol po izolácii DNA a kontrolnom štiepení, pri následnej gélovej elektroforéze v 0,8% agarózovom géli (30 minút, 10 V/cm), enzýmami EcoRI a HincII identifikovať v jednom klone a označil sa ako pFE65.

Kódujúca oblasť génu panE je v plazmide pFE65 pod kontrolou promotora tac kódovaného plazmidom pKK223-3. Plazmid pFE65 sa elektroporoval do kmeňa *E. coli* K12 MG1655 a transformanty sa po následnej inkubácii počas 24 hodín pri 37 °C selektovali na agare LB, ktorý bol zmiešaný so 100 μ g/ml ampicilínu. Získaný kmeň sa označil ako *E. coli* K12 MG1655/pFE65.

Príklad 5

Nadmerná expresia génu *panE* *E. coli* spolu s *panB*, *panC* a *panD* *E. coli* v kmeni MG1655 *E. coli* K12

Vychádzajúc z nukleotidovej sekvencie pre gén *panB*, gén *panC* a gén *panD* v *E. coli* K12 MG1655 (EMBL-GenBank: prírastkové číslo L17086) sa syntetizovali primery PCR (MWG Biotech (Ebersberg, Nemecko)). Pomocou primerov *panB* sa mohol z chromozómovej DNA *E. coli* K12 MG1655 amplifikovať fragment DNA s veľkosťou približne 800 bp, pomocou primerov *panD* fragment DNA s veľkosťou približne 400 bp za štandardnej metódy PCR. Pomocou primerov *panC* sa mohol z chromozómovej DNA *E. coli* K12 MG1655 amplifikovať fragment DNA s veľkosťou približne 850 bp modifikovanou štandardnou metódou PCR. Taq-polymeráza sa nahradila Pfu-polymerázou a podmienky tlmenia v násade PCR sa príslušne modifikovali (STRATAGENE (Heidelberg, Nemecko), opis produktu Pfu-polymeráza, Code no. 600135). Chromozómová DNA *E. coli* K12 MG1655, použitá na PCR, sa izolovala pomocou kitu NucleoSpin + T. Veľkosť všetkých amplifikátov sa stanovila delením gélovou elektroforézou (30 minút, 10 V/cm) v 0,8% agarózovom géli.

Primer PCR pre gén *panB* z *E. coli*:

panB1 5' - AGGATACGTTATGAAACCGA -3'

panB2 5' -ACAACGTGACTCCTTAATGG -3'

Primer PCR pre gén *panC* z *E. coli*:

panC1 5' - AGGAGTCACGTTGTGTTAAT -3'

panC2 5' -AAGTATTACGCCAGCTCGAC -3'

Primer PCR pre gén panD z *E. coli*:

panD1 5' - AGGTAGAAGTTATGATTCGC -3'

panD2 5' - TAACAATCAAGCAACCTGTA -3'

Produkt PCR génu panB sa transformoval do plazmidu pCR[®]2.1 a do kmeňa TOP10F' (Invitrogen (Leek, Holandsko). Úspech klonovania produktu PCR panB sa dokázal štiepením DNA plazmidu pCR[®] 2.1panB restriktčnými enzýmami EcoRI, EcoRV (Pharmacia Biotech (Freiburg, Nemecko), opis produktu EcoRV, Code no. 27-0934-01) a PvuII (Pharmacia Biotech (Freiburg, Nemecko), opis produktu PvuII, Code no. 27-0960-01). Na to sa izolovala plazmidová DNA pomocou kitu QIAprep Spin Plasmid a po štiepení v 0,8% agarózovom géli (30 minút, 10V/cm) sa delila. Produkt PCR génu panD sa transformoval do plazmidu pCR[®] 2.1 a do kmeňa TOP10F' (Invitrogen (Leek, Holandsko). Úspech klonovania produktu PCR panD sa dokázal štiepením DNA plazmidu pCR[®] 2.1panD restriktčnými enzýmami EcoRI, EcoRV a HincII. Na to sa izolovala plazmidová DNA pomocou kitu QIAprep Spin Plasmid a po štiepení v 0,8% agarózovom géli (30 minút, 10V/cm) sa delila. Produkt PCR génu panC sa transformoval do plazmidu pUC19 (Viera, Gene 1982 19:259-268) a elektroporoval do kmeňa *E. coli* DH5 α mcrr. Úspech klonovania produktu PCR panC sa dokázal štiepením DNA plazmidu pUC19panC restriktčnými enzýmami EcoRI, HindIII a SalI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Nemecko), opis produktu SalI, Code no. 27-0882-01). Na to sa izolovala plazmidová DNA pomocou kitu QIAprep Spin Plasmid a po štiepení v 0,8% agarózovom géli (30 minút, 10V/cm) sa delila. Skonstruovaný plazmid sa nazval pFE60.

Na izoláciu génu panB z plazmidu pCR[®]2.1panB sa izolovaná plazmidová DNA štiepila enzýmom EcoRI, štiepna násada sa delila v 0,8% agarózovom géli (30 minút, 10V/cm) a fragment panB 800 bp sa izoloval pomocou kitu GLASSMAX[™]. Izolovaný fragment panB sa pomocou T4-DNA-ligázy ligoval s plazmidom pKK223-3, taktiež štiepeným EcoRI, a kmeň *E. coli* DH5 α mc^r sa elektroporoval s ligačnou násadou. Selekcia buniek nesúcich plazmid sa uskutočňovala rozostretím elektroporačnej násady na agar LB, ktorý bol zmiešaný so 100 μ g/ml ampicilínu, a následnou inkubáciou 24 hodín pri 37 °C. Hľadaný plazmid sa mohol po izolácii DNA a kontrolnom štiepení, pri následnej gélovej elektroforéze v 0,8% agarózovom géli (30 minút, 10 V/cm) identifikovať v jednom klone restriktčnými enzýmami EcoRI, EcoRV a PvuII a označil sa ako pFE40. Kódujúca oblasť génu panB je v plazmide pFE40 pod kontrolou tac-promótoru kódovaného plazmidom pKK223-3.

Na izoláciu génu panD z plazmidu pCR[®]2.1panD sa izolovaná plazmidová DNA štiepila enzýmom EcoRI, štiepna násada sa delila v 0,8% agarózovom géli (30 minút, 10V/cm) a fragment panD 400 bp sa izoloval pomocou kitu GLASSMAX[™]. Izolovaný fragment panD sa pomocou T4-DNA-ligázy ligoval s plazmidom pKK223-3, taktiež štiepeným EcoRI, a kmeň *E. coli* DH5 α mc^r sa elektroporoval s ligačnou násadou. Selekcia buniek nesúcich plazmid sa uskutočňovala rozostretím elektroporačnej násady na agar LB, ktorý bol zmiešaný so 100 μ g/ml ampicilínu a následnou inkubáciou 24 hodín pri 37 °C. Hľadaný plazmid sa mohol po izolácii DNA a kontrolnom štiepení, pri následnej gélovej elektroforéze v 0,8% agarózovom géli (30 minút, 10 V/cm) identifikovať v jednom klone restriktčnými enzýmami EcoRI, EcoRV a HincII a označil sa ako pFE50. Kódujúca oblasť génu panD je v plazmide pFE50 pod kontrolou tac-promótoru kódovaného plazmidom pKK223-3.

Gén panC sa štiepením pomocou HindIII-SmaI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Nemecko), opis produktu SmaI, Code no. 27-0942-01) izoloval z plazmidu pFE60, na to sa štiepna násada delila v 0,8% agarózovom géli (30 minút, 10 V/cm) a fragment panB 850 bp sa izoloval pomocou kitu GLASSMAX™. Izolovaný fragment panC sa pomocou T4-DNA-ligázy ligoval s plazmidom pFE50, taktiež štiepeným HindIII a SmaI, a kmeň *E. coli* DH5 α mc r sa elektroporoval s ligačnou násadou. Selekcia buniek nesúcich plazmid sa uskutočňovala rozostretím elektroporačnej násady na agar LB, ktorý bol zmiešaný so 100 μ g/ml ampicilínu a následnou inkubáciou 24 hodín pri 37 °C. Hľadaný plazmid sa mohol po izolácii DNA a kontrolnom štiepení, pri následnej gélovej elektroforéze v 0,8% agarózovom géli (30 minút, 10 V/cm) identifikovať v jednom klone restriktčnými enzýmami EcoRI, EcoRV, SmaI, HindIII a HincII a označil sa ako pFE52. Kódujúce oblasti génu panD a génu panC sú v plazmide pFE52 pod kontrolou tac-promótoru kódovaného plazmidom pKK223-3 a tvoria jeden operón.

Do miesta strihu EcoRI nasledujúcom po tac-promótoře plazmidu pFE52 sa klonoval gén panB a získaný plazmid sa označil pFE70. Gén panB sa na to izoloval z agarózového gélu (30 minút, 10 V/cm), v ktorom sa delila EcoRI-restriktčná násada plazmidu pFE40. Ligácia sa uskutočňovala pomocou T4-DNA-ligázy. Po elektroporácii ligačnej násady do kmeňa SJ2 sa transformanty selektovali na agarovom médiu E, ktoré bolo zmiešané s 0,4% glukózy, 100 μ g/ml tiamínu a 100 μ g/ml ampicilínu. DNA z kolónií rezistentných na ampicilín sa izolovala pomocou kitu QIAprep Spin Plasmid a úspech klonovania sa overoval štiepením pomocou EcoRI, EcoRV, SmaI, HindIII a HincII a následným delením v 0,8% agarózovom géli (30 minút, 10 V/cm). Kódujúce oblasti génu panB, génu panD a génu panC

sú v plazmide pFE70 pod kontrolou tac-promótoru kódovaného plazmidom pKK223-3 a tvoria jeden operón.

Gén panE sa štiepením pomocou HindIII-SphI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Nemecko), opis produktu SphI, Code no. 27-0951-01) izoloval z plazmidu pFE65, na to sa štiepna násada sa delila v 0,8% agarózovom géli (30 minút, 10 V/cm) a fragment panE sa izoloval pomocou kitu GLASSMAX™. Izolovaný fragment panE sa pomocou T4-DNA-ligázy ligoval s plazmidom pFE70, taktiež štiepeným HindIII a čiastočne SphI, a kmeň FE5 sa elektroporoval s ligačnou násadou. Selekcia buniek nesúcich plazmid sa uskutočňovala rozostretím elektroporačnej násady na médiumE-agar + glukóza (0,4%) + 50 µg/ml izoleucínu + 50 µg/ml ketoizovalerátu, ktorý bol zmiešaný so 100 µg/ml ampicilínu a následnou inkubáciou 48 hodín pri 37 °C. Hľadaný plazmid sa mohol po izolácii DNA a kontrolnom štiepení, pri následnej gélovej elektroforéze v 0,8% agarózovom géli (30 minút, 10 V/cm), identifikovať v jednom klone restriktčnými enzýmami EcoRI, EcoRV, SphI, HindIII a HincII a označil sa ako pFE80. Kódujúce oblasti génu panB, génu panD, génu panC a génu pan E sú v plazmide pFE80 pod kontrolou tac-promótoru kódovaného plazmidom pKK223-3 a tvoria jeden operón.

Plazmid pFE80 sa elektroporoval do kmeňa *E. coli* K12 MG1655 a transformanty sa selektovali na agare LB, ktorý bol zmiešaný so 100 µg/ml ampicilínu, a následnou inkubáciou 24 hodín pri 37 °C. získaný kmeň sa označil ako MG1655/pFE80.

Príklad 6

Nadmerná expresia génu *panE* *E. coli* spolu s *panB*, *panC* a *panD* *E. coli* v mutante *E. coli* K12 MG1655, rezistentnom na valín

Kmeň *E. coli* K12 MG1655 sa naniesol na médiumE-agar, ktorý bol zmiešaný s 0,4 % glukózy a 100 µg/ml valínu (Sigma, Deisenhofen, Nemecko), V0258). Po 48 hodinách inkubácie pri 37 °C sa mohla izolovať jedna kolónia. Tento kmeň sa označil ako FE6. Plazmid pFE80 sa elektroporoval do kmeňa FE6 a transformanty sa selektovali na agare LB, ktorý bol zmiešaný so 100 µg/ml ampicilínu, a následnou inkubáciou 24 hodín pri 37 °C. Získaný kmeň sa označil ako FE6/pFE80.

Príklad 7

Nadmerná expresia génu *panE* *E. coli* spolu s *panB*, *panC* a *panD* *E. coli* v mutante *avtA::aadB* *E. coli* K12 MG1655

Vychádzajúc z nukleotidovej sekvencie pre gén *avtA* (EMBL-GenBank: prírastkové číslo Y00490) v *E. coli* K12 MG1655 sa syntetizovali primery PCR (MWG Biotech (Ebersberg, Nemecko)). Pomocou týchto primerov sa mohol štandardnou metódou PCR z chromozómovej DNA *E. coli* K12 MG1655 amplifikovať fragment DNA s veľkosťou približne 1,6 kbp. Veľkosť sa stanovila delením gélovou elektroforézou (30 minút, 10 V/cm) v 0,8% agarózovom géli.

Primer PCR pre gén *avtA* *E. coli*:

avtA1 5' - TGCTCTCTCTCAACGCCGAA -3'

avtA2 5' - GAAGCCGCCAACCAGGATAA -3'

Produkt PCR génu avtA sa transformoval do plazmidu pCR[®]2.1 a do kmeňa TOP10F' (Invitrogen (Leek, Holandsko). Úspech klonovania sa dokázal štiepením DNA plazmidu pCR[®]2.1avtA restriktívnymi enzýmami EcoRI a SmaI. Na to sa izolovala plazmidová DNA pomocou kitu QIAprep Spin Plasmid a po štiepení v 0,8% agarózovom géli (30 minút, 10 V/cm) sa delila. Do miesta strihu SmaI plazmidu pCR[®]2.1avtA sa klonoval gén aadB a získaný plazmid sa nazval pFE23. Gén aadB sa na to izoloval z agarózového gélu (30 minút, 10 V/cm), v ktorom sa delila restriktívna násada SmaI plazmidu pHP45Ω (EMBL-GenBank: prírastkové č. K02163). Ligácia sa uskutočnila pomocou T4-DNA-ligázy. Po elektroporácii ligačnej násady do kmeňa DH5αmcr sa transformanty selektovali na agare PA, ktorý bol zmiešaný s 20 µg/ml streptomycínu (Sigma, Deisenhofen, Nemecko), Code no. S6501). DNA z kolónií rezistentných na streptomycín sa izolovala pomocou kitu QIAprep Spin Plasmid a úspech klonovania sa overil štiepením pomocou EcoRI a SphI a následným delením v 0,8% agarózovom géli (30 minút, 10 V/cm).

Fragment avtA::aadB sa vyštiepil z plazmidu pFE23 restriktíviou EcoRI, delil 0,8% agarózovom géli (30 minút, 10 V/cm) a izoloval pomocou kitu GLASSMAX[™]. Fragment sa ligoval s plazmidom pMAK705, čiastočne štiepeným EcoRI, pomocou T4-DNA-ligázy, ligačná násada sa elektroporovala do kmeňa DH5αmcr a transformanty sa selektovali pomocou inkubácie na agare LB + 20 µg/ml streptomycínu + 25 µg/ml chloramfenikolu 24 hodín pri 30 °C. DNA z kolónií rezistentných na streptomycín a chloramfenikol sa izolovala pomocou kitu QIAprep Spin Plasmid a úspech klonovania sa dokázal štiepením pomocou SphI a EcoRI v 0,8% agarózovom géli (30 minút, 10 V/cm). Skonstruovaný plazmid sa nazval pFE24.

Pomocou plazmidu pFE24 sa v kmeni *E. coli* K12 MG1655 vymenil chromozomálny gén avtA za alelu avtA::aadB. Na génovú výmenu sa použila modifikovaná metóda podľa Hamilton et al. Plazmid pFE24 sa elektroporoval do kmeňa *E. coli* K12 MG1655 a potom sa na selekciu kointegrátov inkubovali transformanty 24 hodín pri 42 °C na agare LB-chloramfenikol. Získané kolónie sa na rozjednocovanie znova inkubovali nanesené na rovnakom médiu 24 hodín pri 42 °C. Na dezintegráciu plazmidu sa jednotlivé kolónie inkubovali v 5 ml kvapalného média LB 24 hodín pri 42 °C a potom sa rozostrel zriedovacie rad kvapalného média na agar LB-chloramfenikol. Tento zriedovacie rad sa inkuboval 24 hodín pri 30 °C. Na ošetrenie plazmidu sa jednotlivé kolónie získané zo zriedovacieho radu naniesli v 3 za sebou nasledujúcich náteroch jednotlivých kolónií na agar LB vždy na 24 hodín pri 42 °C. Na kontrolu fenotypu sa získané jednotlivé kolónie paralelne naočkovali na agarové platne s nasledujúcimi médiami: médium LB + 20 µg/ml streptomycínu a médium LB + 25 µg chloramfenikolu. Tieto médiá sa inkubovali 48 hodín pri 37 °C. Medzi 250 testovanými jednotlivými kolóniami sa nachádzala jedna, ktorej fenotyp indikoval výmenu chromozomálneho génu avtA za fragment avtA::aadB. Tento kmeň sa označil ako FE7.

Plazmid pFE80 sa elektroporoval do kmeňa FE7 a transformanty sa selektovali na agare LB, ktorý bol zmiešaný so 100 µg/ml ampicilínu, následnou inkubáciou 24 hodín pri 37 °C. Získaný kmeň sa označil jako FE7/pFE80.

Príklad 8

Stanovenie aktivity ketopantoátoreduktázy v rôznych kmeňoch *Escherichia coli* K12

Špecifická aktivita ketopantoátreduktázy sa stanovila podľa metódy opísanej v Shimizu et al. (Journal of Biological Chemistry 263: 12077-12084 (1988)). Na to sa pomocou HybaidLyser (Heidelberg, Nemecko) a RiboLyser Kit Blue získali bunkové extrakty jednotlivých kmeňov. Aktivita ketopantoátreduktázy extraktov sa stanovila na základe spotreby NADPH pri prídavku ketopantoátu. Pre kmeň *E. coli* K12 MG1655 sa stanovila špecifická aktivita ketopantoátreduktázy 6,5 mU/mg, pre kmeň *E. coli* K12 MG1655/pFE65 22,0 mU/mg. V prípade kmeňa FE5 sa nedala odmerať žiadna aktivita.

Príklad 9

Tvorba pantotenátu pomocou rôznych kmeňov *Escherichia coli* K12

Tvorba pantotenátu kmeňmi MG1655, MG1655/pFE32, MG1655/pFE65, MG1655/pFE80, FE6/pFE80 a FE7/pFE80 sa skúmala v dávkovej (batch) kultúre. Ako kultivačné médium sa použilo médiumE, opísané Vogelom (Journal of Biological Chemistry 1956, 218: 97-106), s glukózou (0,4%) ako zdrojom uhlíka. Zloženie použitého média je uvedené v tabuľke 2.

Tabuľka 2

| Zlúčenina | Koncentrácia |
|--|--------------|
| MnSO ₄ ·7H ₂ O | 0,2 g/l |
| Monohydrát kyseliny citrónovej | 2,0 g/l |
| K ₂ HPO ₄ | 10,0 g |
| NaNH ₄ HPO ₄ ·H ₂ O | 3,5 g/l |

250ml Erlenmeyerove banky sa naplnili 20 ml uvedeného živného média a násada sa naočkovala. Po inkubácii 48 hodín pri 37 °C sa stanovila optická hustota a koncentrácia pantotenátu. Na stanovenie hustoty buniek sa použila optická hustota s fotometrom Novaspec II Photometer od firmy Pharmacia (Freiburg, Nemecko) pri meracej vlnovej dĺžke 580 nm. Obsah pantotenátu sa stanovil v sterilne filtrovanom supernatante kultúry. Stanovenie pantotenátu (ako vápenatej soli) sa uskutočnilo pomocou kmeňa *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014 podľa údajov príručky „DIFCO MANUAL“ firmy DIFCO (Michigan, USA; 10th Edition, 1100-1102 (1984)). Výsledok je zhrnutý v tabuľke 3.

Tabuľka 3

| Kmeň | Koncentrácia [µg/ml] | Hustota buniek [OD ₅₈₀] | Produktivita [µg/ml/OD ₅₈₀] |
|--------------|-------------------------|--|--|
| MG1655 | 0,51 | 2,8 | 0,18 |
| MG1655/pFE32 | 1,7 | 2,8 | 0,60 |
| MG1655/pFE65 | 4,6 | 2,9 | 1,6 |
| MG1655/pFE80 | 14,0 | 2,9 | 4,8 |
| FE6/pFE80 | 35,7 | 3,2 | 11,2 |
| FE7/pFE80 | 41,7 | 3,0 | 13,9 |

Príklad 10

Tvorba pantotenátu rôznymi kmeňmi *Escherichia coli* K12 v prítomnosti ketopantoátu

Tvorba pantotenátu kmeňmi MG1655, MG1655/pFE32, MG1655/pFE65 pri pridanom ketopantoáte sa skúmala v dávkovej (batch) kultúre. Na to sa médium opísané v príklade 8 doplnilo 50 µg/ml ketopantoátu. Ostatné podmienky pokusu sú

také, ako sa uvádzajú v príklade 8. Výsledok je zhrnutý v tabuľke 4.

Tabuľka 4

| Kmeň | Koncentrácia [µg/ml] | Hustota buniek [OD ₅₈₀] | Produktivita [µg/ml/OD ₅₈₀] |
|--------------|-------------------------|--|--|
| MG1655 | 6,2 | 2,9 | 2,1 |
| MG1655/pFE32 | 9,0 | 2,9 | 3,1 |
| MG1655/pFE65 | 12,6 | 2,9 | 4,3 |

Príklad 11

Izolácia génu *ilvC* *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

Chromozómová DNA z *C. glutamicum* ATCC13032 sa izolovala tak, ako sa opisuje v Tauch et al. (Plasmid, 33:168-179) a parciálne štiepila restriktívnymi enzýmami Sau3A (Pharmacia Biotech (Freiburg, Nemecko), opis produktu Sau3A, Code no. 27-0913-02). Fragmenty DNA v rozsahu veľkostí 7 až 9 kb sa izolovali pomocou „Nucleotrap Extraction Kit for Nucleic Acids“ (Macherey a Nagel, Düren, Nemecko; Cat. No. 740584) a ligovali do defosforylovaného miesta strihu BamHI vektora pUC19 (Viera et al., 1982, Gene, 19:259-268; MBI Fermentas, Litva). Ligácia sa uskutočnila tak, ako sa opisuje v Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor), pričom zmes DNA s T4-ligázou (Pharmacia Biotech (Freiburg, Nemecko) sa inkubovala cez noc. Táto ligočná zmes sa následne elektroporovala do kmeňa *E. coli* DH5aMCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A., 87:4645-4649) (Tauch, 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-348) a rozostrela na agar LB (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100 mg/ml ampicilínu. Po

inkubácii počas 24 hodín pri 37 °C sa mohla získať z transformantov génová banka *C. glutamicum* reizoláciou plazmidovej DNA podľa „metódy alkalického lýzy“ od Birnboima a Dolyho (1997, *Nucleic Acids Research*, 7: 1513-1523). Pomocou tejto génovej banky sa elektroporovali kompetentné bunky kmeňa FE5 *E. coli*, ktorý nesie mutácie v géne *panE* a *ilvC*. Elektroporačná násada sa v nadväznosti na regeneračnú fázu (Tauch et al., 1994, *FEMS Microbiological Letters*, 123:343-348) dvakrát premyla médiom E (Vogel and Bonner, 1956, *Journal of Biological Chemistry*, 218:97-106). Selekcia transformantov sa uskutočnila rozostretím na médium E-agar + glukóza (0,4 %) + 100 µg/ml ampicilínu + 50 µg/ml izoleucínu + 50 µg/ml ketoizovalerátu. Zo 4 získaných kolónií sa pomocou kitu QIAprep Spin Plasmid izolovala plazmidová DNA. Štiepením *Xba*I plazmidovej DNA a následným delením v 0,8% agarózovom géli (30 minút, 10 V/cm) sa ukázalo, že pri plazmidoch sa jednalo o vektory pUC19 s približne 6,5 kbp veľkými inzertami. Sekvencovanie inzertov s následným porovnaním homológie pomocou programu BLAST (Altschul, *Journal of Molecular Biology* 1990, 215: 403-410) ukázalo, že inzerty vo všetkých prípadoch obsahovali úplný gén *ilvC* z *C. glutamicum* (EMBL-GenBank: prírastkové č. L09232). Jeden z týchto plazmidov sa označil ako pFE90.

Príklad 12

Expresia génu *ilvC* *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 v *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

Na expresiu génu *ilvC* z *C. glutamicum* v *C. glutamicum* sa použil plazmid pECm3. Plazmid pECm3 je derivátom plazmidu pECm2 (Tauch, 1994, *FEMS Microbiological Letters*, 123:343-348), ktorého gén rezistencie na kanamycín sa odstránil

pomocou restrikcie BglII (Pharmacia Biotech (Freiburg, Nemecko), opis produktu BglII, Code no. 27-0946-02) a BamHI s následnou religáciou. Plazmidy pECm2 a pECm3 sú schopné replikácie v *E. coli* aj v *C. glutamicum*. Na izoláciu génu *ilvC* z plazmidu pFE90 (príklad 11) sa izolovaná plazmidová DNA štiepila enzýmom XbaI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Nemecko), opis produktu XbaI, Code no. 27-0948-01), štiepna násada sa delila v 0,8% agarózovom géli (30 minút, 10 V/cm) a izoloval sa 6,5 kbp fragment *ilvC* pomocou kitu GLASSMAX™. Izolovaný fragment *ilvC* sa ligoval pomocou T4-DNA-ligázy s plazmidom pECm3, taktiež štiepeným XbaI, a kmeň FE5 *E. coli* sa elektroporoval s ligačnou násadou. Selekcia buniek nesúcich plazmid sa uskutočňovala rozostretím elektroporačnej násady na agar LB, ktorý bol zmiešaný s 50 µg/ml chloramfenikolu, a následnou inkubáciou 24 hodín pri 37 °C. Hľadaný plazmid sa mohol po izolácii DNA a kontrolnom štiepení, pri následnej gélovej elektroforéze v 0,8% agarózovom géli (30 minút, 10 V/cm), identifikovať v jednom klone enzýmom XbaI a označil sa ako pFE91.

Plazmid pFE91 sa elektroporoval do kmeňa *C. glutamicum* ATCC13032 a transformanty sa selektovali na agare LB, ktorý bol zmiešaný so 7,5 µg/ml chloramfenikolu, a následnou inkubáciou 48 hodín pri 30 °C. Získaný kmeň sa označil ako *C. glutamicum* ATCC13032/pFE91.

Príklad 13

Tvorba pantotenátu pomocou *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

Tvorba pantotenátu pomocou kmeňa *C. glutamicum* ATCC13032/pFE91 sa skúmala v médiu CGXII (Keilhauer et al.,

1993, *Journal of Bacteriology*, 175:5595-5603) s 10 mg/ml chloramfenikolu, v ďalšom texte označovanom ako testovacie médium *C. glutamicum*. Toto médium je uvedené v tabuľke 5. Po 50 ml čerstvo nasadeného testovacieho média *C. glutamicum* sa naočkovovalo 16-hodinovou kultúrou (testovacie médium *C. glutamicum*, 30 °C, 150 Upm) s hustotou buniek o.D.₅₈₀ 0,1. Po 48-hodinovej inkubácii pri 30 °C a 150 U/min sa bunky odstránili 10-minútovou centrifugáciou pri 5000 x g, supernatant sa sterilne filtroval a stanovila sa koncentrácia pantotenátu. Hustota buniek sa stanovila tak, ako sa opisuje v príklade 9.

Stanovenie pantotenátu (ako vápenatej soli) sa uskutočnilo pomocou kmeňa *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014 podľa údajov príručky „DIFCO MANUAL“ firmy DIFCO (Michigan, USA; 10th Edition, 1100-1102 (1984)). Výsledok je uvedený v tabuľke 6.

Tabuľka 5

| Zložka | Koncentrácia na liter | Poznámka |
|---|-----------------------|---------------------------|
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 20 g | |
| Močovina | 5 g | |
| KH_2PO_4 | 1 g | |
| K_2HPO_4 | 1 g | |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,25 g | |
| MOPS | 42 g | |
| CaCl_2 | 10 mg | |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 10 mg | |
| $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 10 mg | |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 1 mg | |
| CuSO_4 | 0,2 mg | |
| $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,02 mg | |
| Biotín | 0,5 mg | |
| Glukóza | 40 g | Oddelene auto- klávaná |
| Kyselina protokatechová | 0,03 mg | Sterilne filtrovaná |

Tabuľka 6

| Kmeň | Koncentrácia [$\mu\text{g}/\text{ml}$] | Hustota buniek [OD_{580}] | Produktivita [$\mu\text{g}/\text{ml}/\text{OD}_{580}$] |
|-----------------|---|---|---|
| ATCC13032 | 0,2 | 20 | 0,010 |
| ATCC13032/pFE91 | 0,3 | 20 | 0,015 |

Príklad 14

Expresia génu panE *Saccharomyces cerevisiae*

1. Amplifikácia čítacieho rastra YHR063c:

Vychádzajúc z nukleotidovej sekvencie čítacieho rastra YHR063c *Saccharomyces cerevisiae* (prírastkové číslo U00061 National Center for Biotechnology, Bethesda, MD, USA) sa syntetizovali nasledovné PCR-primery (MWG-Biotech, Ebersberg, Nemecko). Začiatok, popřípade koniec čítacieho rastra je označený bodkou (.):

oJD539 (5' EcoRI-NotI START):

5'- GCG CGA ATT CAG ATC CGC GGC CGC AAA GAG GAG AAA TTA
ACT.ATG ACT GCA CCA CAC AGA AG -3'

oJD540 (3' SpeI-PstI STOP):

5'- CGC GAC TAG TCT GCA G.TC AGT CCT TTC TCC AGT CAC-3'

Ako templát slúžila genómová DNA kmeňa JD242 *S. cerevisiae*, ktorá sa izolovala podľa metódy od C. Guthrieho a G. R. Finka (Guide to yeast genetics and molecular biology, Methods in Enzymology, zv. 194, Academic Press, San Diego, CA, 1991). Tento kmeň je haploidným segregantom diploidného kmeňa SC288C (Winston et al., Yeast 11, 53 a ďalej, (1995)), ktorého genóm sa sekvencoval (Goffeau et al., Science 274, str. 546, (1996)). Tetradenová analýza sa uskutočňovala podľa metódy C. Guthrieho a G. R. Finka (Guide to yeast genetics and molecular biology, Methods in Enzymology, zv. 194, Academic Press, San Diego, CA, 1991). Kmeň JD242 je auxotrofný pre leucín (alela leu2Δ1) a uracil (alela ura3-52). Fragment DNA s veľkosťou pri-

bližne 1,2 kB sa mohol amplifikovať použitím kitu „High Fidelity Expand Polymerase“ od firmy Roche (Mannheim) 28 cyklami PCR za podmienok uvedených výrobcom. Veľkosť sa stanovila elektroforetickým delením v 0,8% agarózovom géli.

2. Konštrukcia pJD-YHR063c:

Na expresiu čítacieho rastra YHR063c v *S. cerevisiae* sa vložil PCR-amplifikát do kyvadlového vektora pJDCEX2 *E. coli* - *S. cerevisiae* (obrázok 8 a Dohmen at al., 1995, Journal of Biological Chemistry 270, 18099-18109).

Produkt PCR sa restringoval pomocou EcoRI a SpeI (AGS, Heidelberg, Nemecko). Následne sa zmiešal s pJDCEX2-DNA, ktorá bola spracovaná EcoRI a XbaI (AGS, Heidelberg, Nemecko), a ligoval s T4-DNA-ligázou (Roche, Mannheim, Nemecko). Ligačná násada sa transformovala do kmeňa XL1-Blue *E. coli* (Bullock et al., 1987, Biotechniques 5, 376). Transformant sa získal selekciou na agare LB, ktorý obsahoval 150 µg/ml ampicilínu (Sigma, Diesenhofen, Nemecko). Plazmidová DNA z klonov rezistentných na ampicilín sa preparovala alkalicou lýzou (Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Izolovaná plazmidová DNA sa skúmala restrikciou pomocou NotI a PstI a následným delením v 0,8% agarózovom géli. Plazmid so žiadanou štruktúrou dostal názov pJD-YHR063c (obrázok 9). Sekvencia v produkte PCR klonovanom pJD-HYR063c sa overovala sekvencovaním s oligonukleotidmi oJD105 a oJD106.

OJD105 (T-CYC1):

5'-GAAGTCATCGAAATAG-3'

oJD106 (P-CUP1):

5-TCGTTTCTGTCTTTTTC-3'

3. Konštrukcia pKK-YHR063c:

Na konštrukciu čítacieho rastra YHR063c v *E. coli* sa použil plazmid pKK223-3 (Brosius and Holy, Proceedings of the National Academy of Science USA 81, 6929 (1984)). Na to sa plazmid pJD-YHR063c najskôr restringoval s EcoRI a PstI (AGS, Heidelberg, Nemecko). Fragment YHR063c s veľkosťou približne 1,2 kB sa po elektroforetickom delení v 0,8% agarózovom géli z tohto vystrihol a DNA sa izolovala kitom QiaexII Gel Extraktion (Qiagen, Hilden, Nemecko). Následne sa ligovala do plazmidu pKK223-3, ktorý bol otvorený pomocou EcoRI a PstI, T4-DNA-ligázou (Roche, Mannheim, Nemecko). Ligačná násada sa transformovala do kmeňa XL1-Blue *E. coli* (Stratagene, LaJolla, CA, USA. Transformant sa získal selekciou na médiu LB, ktoré obsahovalo 150 µg/ml ampicilínu (Sigma, Deisenhofen, Nemecko). Plazmidová DNA z klonov rezistentných na ampicilín sa preparovala alkalickou lýzou (Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Úspech klonovania sa skúmal restrikciami pomocou EcoRI a PstI a následným delením v 0,8% agarózovom géli. Plazmid so žiadanou štruktúrou dostal názov pKK-YHR063c.

Príklad 15

Komplementácia mutantu FE5 *E. coli*

Na analýzu funkcie panE čítacieho rastra z *S. cerevisiae* sa skúmalo, či expresia tohto čítacieho rastra môže komplementovať potrebnosť kyseliny pantoténovej kmeňa FE5 *E. coli* (príklad 1). Tento kmeň je v mutovaný do genloci panE a ilvC. Na to sa najskôr kmeň FE5 transformuje plazmidom

pKK-YHR063c.

Následne sa skúmal rast kmeňa FE5/pKK-YHR063c na minimálnom agare M9 (Sambrook et al.: Molecular Cloning a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), ktorý bol doplnený 50 µg/ml ketoizovalerátu (Kiv) a 50 µg/ml izoleucínu (Ile), v závislosti od prídavku pantotenátu (50 µg/ml). Ako negatívna kontrola slúžil kmeň FE5/pKK223-3 a ako pozitívna kontrola kmeň FE4/pFE65 (príklad 4). Tabuľka 7 ukazuje výsledok pokusu: Čítací raster YHR063c *S. cerevisiae* nachádzajúci sa v plazmide pKK-YHR063c komplementuje dvojnásobnú mutáciu panE-ilvC kmeňa FE5 *E. coli*. Čítací raster YHR063c má funkciu génu panE.

Tabuľka 7

| Kmeň | M9 + Kiv + Ile s pantotenátom | M9 + Kiv + Ile bez pantotenátu |
|----------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| FE5/pFE65 | rast | rast |
| FE5/pKK223-3 | rast | žiadny rast |
| FE5/pK-YHR063c | rast | rast |

Príklad 16

Stanovenie aktivity ketopantoátoreduktázy v rôznych kmeňoch *Saccharomyces cerevisiae*

Kmeň JD242 *S. cerevisiae* (viď príklad 14) sa transformoval plazmidmi pJDCEX2 a pJD-YHR063c podľa metódy Dohmen et al. (Dohmen et al., Yeast 7, 691(1991)). Selekcia transformantov sa uskutočňovala na minimálnom médiu bez leucínu s 0,8% agarom (viď tab. 8a,b).

Ako živné médium sa použil variant minimálneho média Yeast Nitrogen Base (YNB), opísaného v Difco-Manual (Michigan, USA;, 10th Edition, 1100-1102 (1984)), neobsahujúci kyselinu pantoténovú. Médium obsahovalo prídavne glukózu (2%), uracil (40 $\mu\text{g/ml}$), CuSO_4 (150 μM) na indukciu P_{CUP1} -promotóra suplementu pJDCEX2 a pJD-YHR-063c, -Leu Drp-Out od firmy CLONTECH (Heidelberg, Nemecko, Cat. No. 8605-1) (650 $\mu\text{g/ml}$) a suplementy ketopantoát (100 $\mu\text{g/ml}$) a β -alanín (100 $\mu\text{g/ml}$). Zloženie použitého média je uvedené v tabuľke 8a a b.

Tabuľka 8a:

| Zložka | Koncentrácia na liter |
|---|-----------------------|
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 5 g |
| KH_2PO_4 | 1 g |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,5 g |
| NaCl | 0,1 g |
| CaCl_2 | 0,1 g |
| H_3BO_3 | 500 μg |
| CuSO_4 | 40 μg |
| KI | 100 μg |
| $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 200 μg |
| $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 400 μg |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 400 μg |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 200 μg |
| Biotín | 2 μg |
| Kyselina folová | 2 μg |
| Inozitol | 2 mg |
| Niacín | 400 μg |
| Kyselina p-aminobenzoová | 200 μg |
| Pyridoxínhydrochlorid | 400 μg |
| Riboflavín | 200 μg |
| Tiamínhydrochlorid | 400 μg |

Tabuľka 8b:

| Prísada | Množstvo na liter |
|-------------------|-------------------|
| Glukóza | 20 g |
| Uracil | 40 mg |
| CuSO ₄ | 24 mg |
| -Leu DO suplement | 650 mg |
| Ketopantoát | 100 mg |
| β-Alanín | 100 mg |

250ml Erlenmeyerove banky sa naplnili 50 ml uvedeného živného média, násada sa naočkovała pomocou očka s jednotlivou kolóniou agarovej platne (viď tab. 8a,b) a inkubovala 72 hodín pri 30 °C a 175 U/min. Touto predkultúrou sa naočkovało 50 ml rovnakého živného média v 250ml Erlenmeyerovej banke tak, aby mala optickú hustotu (580 nm) 0,5. Po 24 hodinách kultivácie pri 30 °C a 175 U/min sa merala optická hustota fotometrom Novaspec II od firmy Pharmacia (Freiburg, Nemecko) pri meracej vlnovej dĺžke 580 nm. Pre obidve kultúry mala hodnotu 4,0. Špecifická aktivita ketopantoátreduktázy kmeňov *S. cerevisiae* JD242/pJDCEX2 a pJD242/pJD-YHR063c sa stanovila podľa metódy opísanej v Shimizu et al. (Journal of Biological Chemistry 263: 12077-12084 (1988)).

Na to sa pomocou Hybaid RiboLyser (Heidelberg, Nemecko) a RiboLyser Kit Red získali bunkové extrakty jednotlivých kmeňov. Aktivita ketopantoátreduktázy extraktov sa stanovila na základe spotreby NADPH pri prídavku ketopantoátu. Obsah proteínov sa zistil podľa Bradfordovej metódy (Bradford, Analytical Biochemistry 72, 248 a ďalej, (1976)). Pre kontrolný kmeň JD242/pJDCEX2 sa stanovila špecifická aktivita

ketopantoátreduktázy 3 mU/mg proteínu a pre kmeň JD242/pJD-YHR063c špecifická aktivita 386 mU/mg proteínu.

Príklad 17

Tvorba pantotenátu rôznymi kmeňmi *Saccharomyces cerevisiae*

Tvorba pantotenátu kmeňmi *S. cerevisiae* JD242/pJDCEX2 a JD242/pJD-YHR063c sa skúmala v dávkovej (batch) kultúre.

250ml Erlenmeyerove banky sa naplnili 50 ml živného média uvedeného v tab. 8a,b, násada sa naočkovala pomocou očka s jednotlivou kolóniou z agarovej platne (viď tab. 8a,b) a inkubovala 72 hodín pri 30 °C a 175 U/min. Touto predkultúrou sa naočkovalo 50 ml rovnakého živného média v 250ml Erlenmeyerovej banke tak, aby mala optickú hustotu (580 nm) 0,5. Po 24 hodinách kultivácie pri 30 °C a 175 U/min sa stanovila optická hustota a koncentrácia pantotenátu. Na stanovenie hustoty buniek sa merala optická hustota fotometrom Novaspec II od firmy Pharmacia (Freiburg, Nemecko) pri meracej vlnovej dĺžke 580 nm. Obsah pantotenátu sa stanovil v sterilne filtrovanom supernatante kultúry.

Stanovenie pantotenátu (ako vápenatej soli) sa uskutočňovalo pomocou kmeňa *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014 podľa údajov príručky „DIFCO MANUAL“ firmy DIFCO (Michigan, USA; 10th Edition, 1100-1102 (1984)). Výsledok je zhrnutý v tabuľke 9.

Tabuľka 9

| Kmeň <i>S. cerevisiae</i> | Koncentrácia [$\mu\text{g/ml}$] | Hustota buniek [OD ₅₈₀] | Produktivita [$\mu\text{g/ml/OD}_{580}$] |
|---------------------------|--------------------------------------|--|---|
| JD242/pJDCEX2 | 0,93 | 4,0 | 0,023 |
| JD242/pJD-YHR063c | 1,12 | 4,1 | 0,027 |

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Spôsob výroby a zlepšenia mikroorganizmov produkujúcich kyselinu pantoténovú zosilnením, najmä nadmernou expresiou nukleotidových sekvencií kódujúcich ketopantoátreduktázu, najmä génu panE, jednotlivo alebo navzájom kombinovane, a poprípade doplnkovo génu ilvC.

2. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že na dosiahnutie nadmernej expresie sa zvyšuje počet kópií génov, poprípade nukleotidových sekvencií v mikroorganizmoch pomocou inzercie plazmidových vektorov nesúcich tieto gény, poprípade nukleotidové sekvencie.

3. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že na dosiahnutie nadmernej expresie sa mutuje promótorová a regulačná oblasť nachádzajúca sa proti smeru štruktúrneho génu.

4. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že na dosiahnutie nadmernej expresie sa zabudujú proti smeru štruktúrneho génu expresívne kazety.

5. Spôsob podľa nárokov 1 až 4, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa v mikroorganizmoch zosilňujú, najmä nadmerne exprimujú nukleotidové sekvencie kódujúce ketopantoátreduktázu, ktoré majú jednu alebo viac mutácií rezistencie voči metabolitom a/alebo antimetabolitom.

6. Spôsob podľa nárokov 2 až 5, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že na dosiahnutie zosilnenia alebo nadmernej expresie sa mení kultivačné médium a/alebo uskutočnenie fermentácie.

7. Spôsob podľa nárokov 1 až 6, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa v mikroorganizmoch eliminujú metabolické dráhy, ktoré znižujú tvorbu pantotenátu (kyseliny pantoténovej).

8. Spôsob podľa nároku 7, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa eliminuje gén avtA.

9. Spôsob podľa nároku 7, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa eliminuje gén ilvE.

10. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa v mikroorganizmoch, najmä rodov korynebaktérií alebo *E. coli*, nadmerne exprimuje alebo zosilňuje gén ilvC *C. glutamicum*.

11. Spôsob podľa nárokov 1 až 9, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa doplnkovo k nukleotidovým sekvenciám kódujúcim ketopantoátreduktázu zosilňuje, najmä nadmerne exprimuje jeden alebo viacero génov metabolickej dráhy tvorby kyseliny pantoténovej.

12. Spôsob podľa nároku 11, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa doplnkovo zosilňuje, najmä nadmerne exprimuje jeden alebo viacero génov, ktoré kódujú enzýmy ketopantoáthydroxymetyltransferázu (EC 4.1.2.12), aspartát-1-dekarboxylázu (EC 4.1.1.11) a pantotenátsyntetázu (EC 6.3.2.1).

13. Spôsob podľa nárokov 11 a 12, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa používajú rozličné kompatibilné plazmidové vektory, ktoré obsahujú uvedené gény.

14. Spôsob podľa nárokov 10 a 11, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa používa kmeň transformovaný jedným alebo viacerými navzájom kompatibilnými plazmidovými vektormi a plazmidový vektor nesie jeden alebo viacero z uvedených génov vrátane génu panE, v ktorom sú gény usporiadané za sebou a pod kontrolou jedného spoločného promótoru alebo sú usporiadané od seba oddelene pod kontrolou rozdielnych promótorov.

15. Plazmidový vektor pFE80, v y z n a č u j ú c i s a restrikčnou mapou zobrazenou na obrázku 6 a uložený v kmeni MG 1655/pFE80 *E. coli* K12 pod označením DSM 12414.

16. Plazmidový vektor pFE65, v y z n a č u j ú c i s a restrikčnou mapou zobrazenou na obrázku 5 a uložený v kmeni MG1655/pFE65 *E. coli* K12 pod označením DSM 12382.

17. Plazmidový vektor pFE32, v y z n a č u j ú c i s a restrikčnou mapou zobrazenou na obrázku 4 a uloženou v kmeni MG1655/pFE32 *E. coli* K12 pod označením DSM 12413.

18. Kmeň FE6 *E. coli* K12, ktorý nesie rezistenciu na valín.

19. Kmeň FE7 *E. coli* K12, v ktorom je vymenený gén avtA za fragment avtA::aadB, uložený pod označením DSM 12380.

20. Mikroorganizmus (hostiteľská bunka) rodu *E. coli* alebo *Corynebacterium*, ktorý obsahuje jeden z plazmidových vektorov podľa nárokov 11 až 14 a popri prípade jednu alebo viac rezistencií voči metabolitom a/alebo antimetabolitom.

21. *C. glutamicum* ATCC 13032/pFE91, ktorý obsahuje plazmidový vektor pFE91 s génom *ilvC* *C. glutamicum*.

22. Spôsob výroby kyseliny pantoténovej, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa uskutočňujú nasledovné kroky:

- a) fermentácia mikroorganizmov podľa jedného alebo viacerých z predchádzajúcich nárokov,
- b) koncentrovanie kyseliny pantoténovej v médiu alebo v bunkách mikroorganizmov a
- c) izolácia kyseliny pantoténovej.

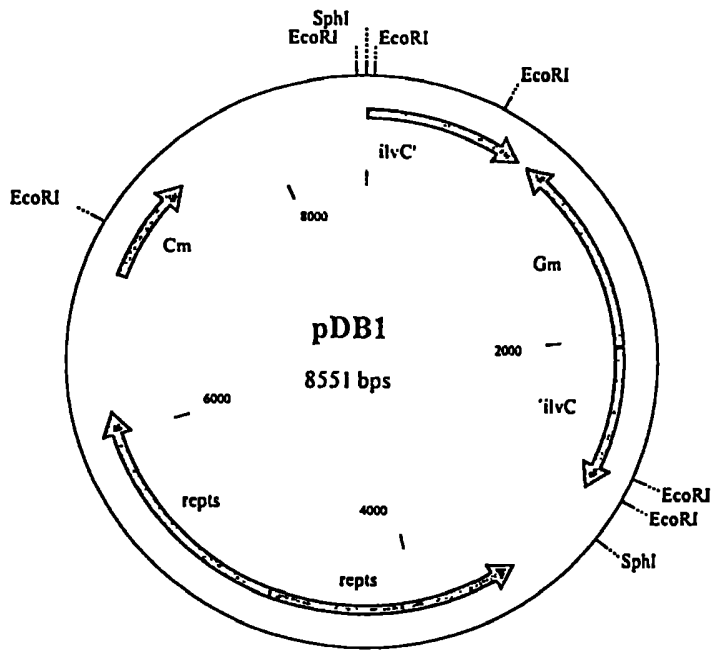
23. Spôsob podľa nároku 22, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa ako prekursor pridáva ketopantoát.

24. Spôsob podľa nároku 23, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa v stupni a) pridáva prekursor kyseliny pantoténovej, zvolený zo skupiny zahŕňajúcej β -alanín a ketoizovalerát.

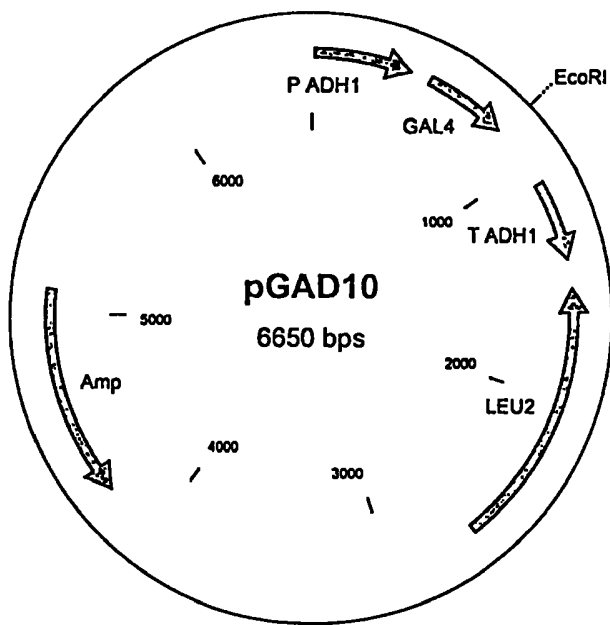
25. Spôsob podľa jedného alebo viacerých z predchádzajúcich nárokov, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa používajú mikroorganizmy rodu *E. coli* alebo *Corynebacterium* alebo kvasinky.

1/9

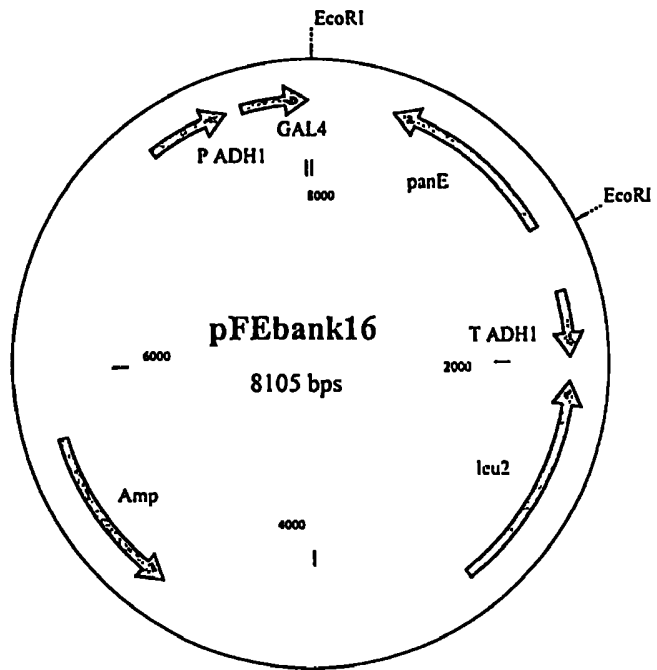
Obr. 1



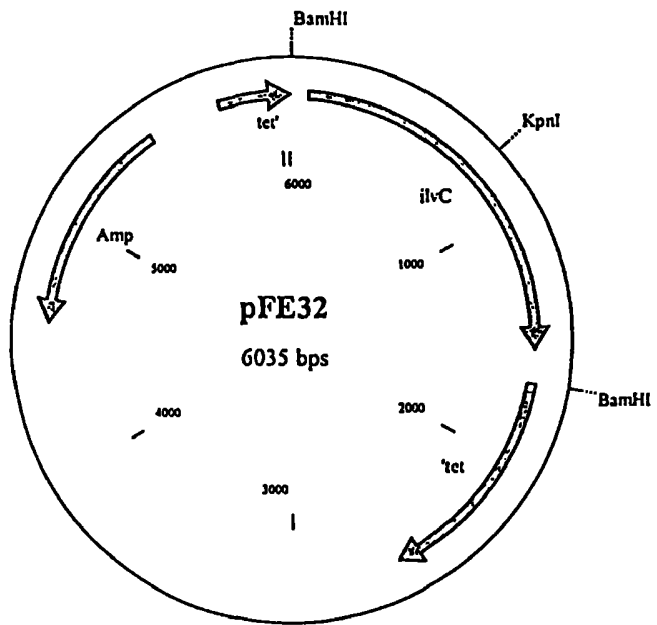
Obr. 2



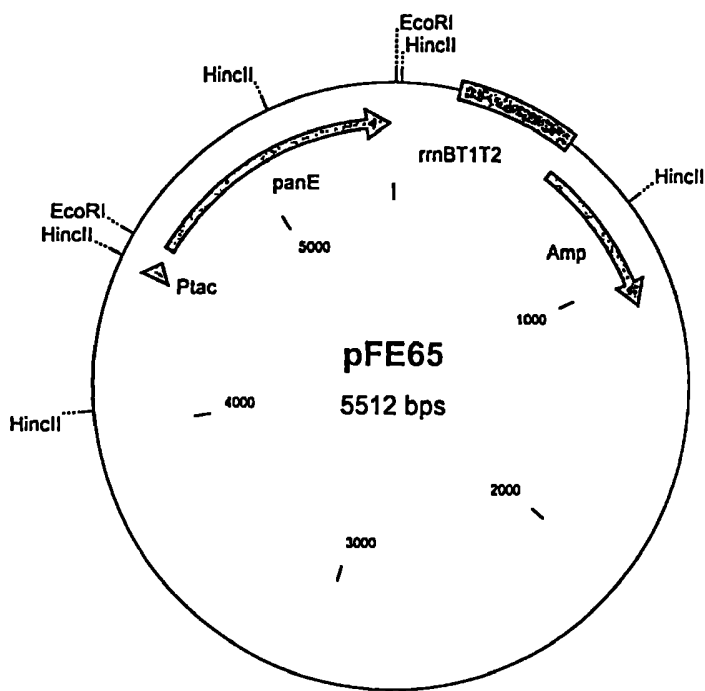
Obr. 3



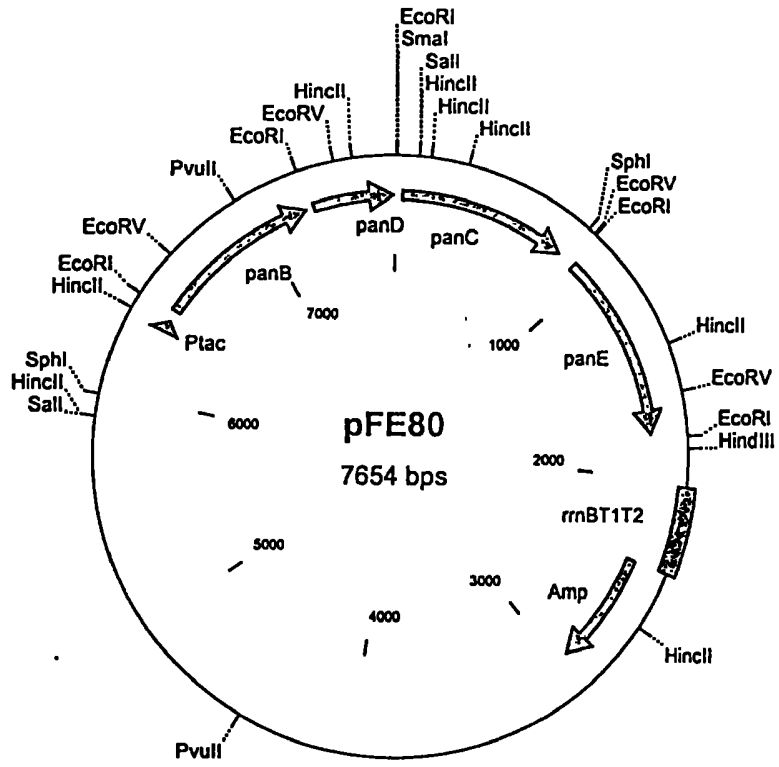
Obr. 4



Obr. 5



Obr. 6



Obr. 7

