

70.664/PA

K I V O N A T

**L-Lizint termelő korineform baktériumok és eljárás L-lizin
előállítására**

A találmány tárgyát fokozott aktivitású lysE génnel (lizin-export-hordozó gén) rendelkező, L-lizint termelő korineform baktériumtörzsek alkotják, amelyekben további gének, mégpedig a dapA gén (dihidropikolinát-szintetáz gén), LysC gén (aszpartát-kináz gén), dapB gén (dihidropikolinát-reduktáz gén) vagy a pyc gén, különösen azonban a dapA gén és a LysC gén fokozott aktivitású, nevezetesen túlexprimált, valamint egy eljárás L-lizin előállítására.

Az L-lizin kereskedelmi szempontból jelentős L-aminosav, amelyet különösen takarmány-adalékként alkalmaznak az állattenyésztésben. A szükséglet az utóbbi évek során állandóan nő.

Jellemző ábra: 1-3. ϕ

20002585

4. 1. 0. 9. 1. / 100

70.664/PA

**L-Lizint termelő korineform baktériumok és eljárás L-lizin
előállítására**

A találmány tárgyát fokozott aktivitású lysE génnel (lizin-export-hordozó gén) rendelkező, L-lizint termelő korineform baktériumtörzsek alkotják, amelyekben további gének, mégpedig a dapA gén (dihidropikolinát-szintetáz gén), lysC gén (aszpartát-kináz gén), dapB gén (dihidropikolinát-reduktáz gén) vagy a pyc gén, különösen azonban a dapA gén és a lysC gén fokozott aktivitású, nevezetesen túlexprimált, valamint egy eljárás L-lizin előállítására.

Az L-lizin kereskedelmi szempontból jelentős L-aminosav, amelyet különösen takarmány-adalékként alkalmaznak az állattenyésztésben. A szükséglet az utóbbi évek során állandóan nő.

Az L-lizint fermentációs úton L-lizint termelő korineform baktérium törzsekkel, különösen Corynebacterium glutamicummal állítják elő. E termék nagy jelentősége miatt állandóan dolgoznak az előállítási eljárás továbbfejlesztésén. Az eljárás továbbfejlesztése irányulhat fermentáció-technikai intézkedésekre, amilyen pl. a keverés és az oxigénnel való ellátás; a közeg összetételére, pl. a fermentáció alatti cukor koncentrációra vagy a termékké való feldolgozásra (pl. ioncserélő kromatográfiával) vagy magának a mikroorganizmusnak a teljesítménnyel kapcsolatos belső tulajdonságaira.

E mikroorganizmusok teljesítménnyel kapcsolatos tulajdonságai továbbfejlesztésére a mutagenézis, szelekció és a mutánsválogatás módszereit alkalmazzuk. Ily módon olyan törzseket kapunk, amelyek rezisztensek antimetabolitokkal - pl. S-/2-amino-etil/-ciszteinnel - szemben vagy egyes aminosavakra - pl. L-leucinra - nézve auxotrófok és L-lizint termelnek. Néhány év óta alkalmazzák a rekombináns DNS technika módszereit is a *Corynebacterium glutamicum* L-lizint termelő törzsei javítására, amelynek során néhány bioszintézis gént amplifikálnak és megvizsgálják ennek hatását az L-lizin termelésre.

Az EP 88 166 a teljesítményfokozást ismerteti az amino-etil-cisztein rezisztenciát közvetítő DNS fragmentum amplifikálása után. Az EP 197 335 a dihidrodipikolinát-szintetázt kódoló dap gén amplifikálás utáni teljesítmény-fokozódásról ír. Az EP 219 027 az aszpartát-szemialdehid-dehidrogenázt kódoló asd gén amplifikáció utáni teljesítmény fokozódásáról számol be. A J.Bact. 175(9), p. 2743-2749 helye (Pisabarro et al.) a dihidropikolinát-reduktázt kódoló dapB génre vonatkozik.

Vizsgálták továbbá a primer anyagcsere génjei amplifikációjának az L-lizin termelésre kifejtett hatását is. Így az EP 219 027 az aszpartát-aminotranszferázt kódoló aspC gén amplifikáció utáni teljesítmény-növekedését mutatja be. Az EP 143 195 és EP 358 940 a foszfoenol-piruvát karboxilázt kódoló ppc gén amplifikáció utáni teljesítmény növekedéséről ír. A DE-A 198 31 609 sz. nyilvánosságra hozatali irat a piruvát-karboxilázt kódoló pyc gén amplifikáció utáni teljesítmény növekedését ismerteti.

Végül a DE-A 195 48 22 sz. nyilvánosságra hozatali iratban azt írják le, hogy a lysE gén által kódolt L-lizin export hordozók fokozott aktivitása elősegíti a lizin termelést.

Ezen leírások szerint, egyes gének amplifikációjára irányuló kísérletek mellett azt is vizsgálták, hogy két vagy több gén gén egyidejű amplifikálása hogyan javíthatja az L-lizin termelést korineform baktériumokban. Így a DE-A 38 23 451 sz. nyilvánosságra hozatali irat az Escherichia coli asd és dapA génje egyidejű amplifikálása után fellépő teljesítmény fokozódásról tudósít. A DE-A 39 43 117 sz. nyilvánosságra hozatali iratból olyan teljesítmény fokozódást ismerhetünk meg, amely egy „feed back” rezisztenciát kódoló lysC-allél és a dapA gén pJC50 segítségével elért egyidejű amplifikációja hatására következik be. Az EP 841 395-ből közelebbről olyan teljesítmény fokozódást ismerhetünk meg, amely egy „feed back” rezisztenciát kódoló lysC-allél és a dapB gén egyidejű amplifikációja hatására következik be; a dapB, lysA és dhh gén további amplifikációjával további javulás érhető el. Az EP 854 189-ből olyan teljesítmény fokozódást ismerhetünk meg, amely egy „feed back” rezisztenciát kódoló lysC-allél és a dapA, dapB, lysA és aspC gén egyidejű amplifikációja hatására következik be. Az EP 857 784-ből közelebbről olyan teljesítmény fokozódást ismerhetünk meg, amely egy „feed back” rezisztenciát kódoló lysC-allél és a lysA gén egyidejű amplifikációja hatására következik be; a ppc gén további amplifikációjával újabb javulás érhető el.

A technika állásában leírt eljárások nagy számából nyilvánvalóvá válik, hogy szükség van újabb eljárások kifejlesztésére

és az ismert eljárások javítására a korineform baktériumokkal végzett lizin-termelés területén.

A találmány szerinti feladat abban áll, hogy új eljárások segítségével javított L-lizin-termelésű korineform baktérium törzseket hozzunk létre.

Az L-lizin kereskedelmi szempontból fontos aminosav, amelyet különösen az állattenyésztésben, takarmányadalékként alkalmaznak.

A következőkben, amikor L-lizint vagy lizint említünk, ezen nemcsak a bázist, hanem a megfelelő sókat is (amilyen pl. a lizin-hidroklorid vagy lizin-szulfát) értjük.

A találmány tárgyát olyan L-lizint termelő, fokozott hatású LysE génnel (lizin-export hordozó gén) rendelkező korineform baktérium törzsek képezik, amelyekre az jellemző, hogy olyan géneket tartalmaznak - amilyen a dapA gén (dihidropikolinát szintetáz gén), lysC gén (aszpartát kináz gén), dapB gén (dihidropikolinát reduktáz gén) és pyc gén (piruvát karboxiláz gén) -, amelyek aktivitását külön-külön vagy együtt fokozhatjuk, előnyösen e géneket túlexprimálhatjuk.

Ezenkívül olyan DNS szekvenciát találtunk, amelyik a dapB gén 5'-tartományában (felfelé) helyezkedik el, a dapB promóter -35- szakaszát hordozza és előnyös a dapB gén kifejeződéséhez. Ezt SERQ-ID-No.1 jellel láttuk el.

Ezért oltalmi igényünk kiterjed egy megfelelő, replikálható DNS-re is, amelynek nukleotid szekvenciája a SEQ-ID-No. 1 jelű.

A találmány további tárgyát a *dapA* promóter MC20 vagy MA16 mutációi képezik, amelyeket a SEQ-ID-No. 5 és SEQ-ID-No. 6 ábrázol (letétbe helyezve a DSM 12868 ill. DSM 12867 számon).

A találmány további tárgyát a fokozott hatású *lysE* génnel rendelkező, L-lizint termelő korineform baktérium törzsek képezik, amelyekre jellemző, hogy egyidejűleg a *dapA* és a *dapB* gén is fokozott hatású, közelebbről túlexprimált.

Végül ugyancsak a találmány tárgyát képezik a fokozott hatású *lysE* génnel rendelkező, L-lizint termelő korineform baktérium törzsek, amelyekre jellemző, hogy egyidejűleg a *dapA* és a *LysC* gén is fokozott hatású, közelebbről túlexprimált.

A „fokozott hatású” kifejezés ebben az összefüggésben egy mikroorganizmusban egy vagy több enzim intracelluláris aktivitásának növekedését jelenti, amely enzimeket a megfelelő DNS kódol, amelynek során növeljük a gén(ek) kópia számát, erős promótort alkalmazunk vagy olyan gént veszünk, amely egy magas aktivitású megfelelő enzimet kódol és adott esetben ezeket a lépéseket kombináljuk.

Ugyancsak a találmány tárgyát képezi egy - ezekkel a korineform baktériumokkal végzett fermentációs - eljárás L-lizin előállítására.

A találmány tárgyát képező mikroorganizmusok lizint képesek előállítani glukózból, szacharózból, laktózból, fruktózból, maltózból, melaszból, keményítőből, cellulózból vagy glicerinből és etanolból, főként glukózból vagy szacharózból. A korineform baktériumok esetében különösen a *Corynebacterium* nemzetségről van szó. A *Corynebacterium* nemzetség esetében elsősorban a *Coryne-*

bacterium glutamicum fajt kell említenünk, amelyről a szakterületen ismert, hogy képes aminosavakat előállítani. Ehhez a fajhoz tartoznak egyes vad típusú törzsek, amilyen pl. a *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Brevibacterium flavum* ATCC 14067, *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965 és az ezekből lezármaztatott törzsek ill. mutánsok. Az L-lizint termelő mutáns korineform baktérium pl. a következők egyike lehet:

Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709

Corynebacterium glutamicum DSM 5714

Corynebacterium glutamicum DSM 12866

Brevibacterium flavum FERM-P 1708

Brevibacterium flavum FERM-P 6463

Brevibacterium flavum FERM-P 6464

Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712.

A *lysE* gén túlexpressziójának az L-lizin termelésére kifejtett előnyös hatása a DE-A-195 48 222 sz. nyilvánossághozatali iratból ismert.

Az L-lizin termelését növeli a *dapB* gén, vagy a *pyc* gén, vagy különösen egy, egy „feed back” rezisztens aszpartát-kinázt kódoló *lysC* allél még nagyobb mértékben fokozott expressziója vagy különösen a *dapA* gén még nagyobb mértékben fokozott expressziója.

Ezenkívül azt állapítottuk meg, hogy a *lysE* gén adott túlexpressziója mellett a *dapA* és *dapB* gén egyidejű, tovább fokozott expressziója további előnyöket biztosít az L-lizin termelés szempontjából.



Ezért igényeljük a SEQ-ID-No. 1 nukleotid szekvenciával rendelkező megfelelő replikálható DNS-t is.

A *lysE* gén adott túlexpressziója mellett ugyancsak előnyös a *dapA* és a *lysC* allél egyidejű, tovább fokozott expressziója.

A fokozás (túlexpresszió) elérésére úgy járunk el, hogy fokozzuk pl. a megfelelő gén kópiaszámát vagy mutációnak vetjük alá a promóter és a regulációs régiókat vagy a struktúrgéntől felfelé elhelyezkedő riboszóma kötőhelyeket. Ugyanilyen módon hatnak az expressziós kazetták, amelyeket a struktúrgéntől felfelé építünk be. Indukálható promóterek segítségével lehetséges továbbá az expresszió fokozása a fermentációs L-lizin termelés során. Az expresszió ugyancsak javítható az m-RNS élettartama növelésére irányuló intézkedésekkel. Az enzimaktivitás az enzim-fehérje lebontása gátlásával is növelhető. A gének vagy gén-struktúrák ennek során vagy a különböző kópiaszámú plazmidokban vannak jelen (inga vektorok), vagy a kromoszómába vannak integrálva és amplifikálva. Egy másik megoldás szerint a szóban forgó gén túlexpressziója a közeg összetétele és a tenyésztési mód megváltoztatása révén is elérhető.

Információkat szolgáltat az előbbiekkal kapcsolatban a szakember számára pl. a következő irodalomjegyzék:

Martin et al., Bio/Technology 5, p. 137-146, 1987

Guerrero et al., Gene 138, p. 35-41, 1994

Tsuchiya és Morigana, Bio/Technology 6, p. 428-430, 1988

Eikmanns et al., Gene 102, p. 93-98, 1991

EP 472 869

US 4 601 893

Schwarzer és Pühler, Bio/Technology 9, p. 84-87, 1991

Reinscheid et al., Applied and Environmental Microbiology 60, p. 126-132, 1994

LaBarre et al., J.Bact. 175, p. 1001-1007, 1993

WO 96/15246

Malumbres et al., Gene 134, p. 15-24, 1993

JP-A-10-229891

Jensen és Hammer, Biotechnology and Bioengineering 58, p. 191-195, 1998 vagy

a Manual of Methods for General Bacteriology, American Society for Bacteriology, Washington D.C., AEÁ

és a genetika és a molekuláris biológia területén ismert tan-
könyvek.

A találmány szerint alkalmazott *Corynebacterium glutamicum* gének ismertek és ismert módszerekkel izolálhatók ill. előállíthatók vagy szintetizálhatók.

A hely-specifikus mutagenézis módszereit többek között Higuchi et al., Nucleic Acid Research 16, p. 7351-7367, 1988 vagy

Silver et al., Handbuch von Innis, Gelfand und Sninsky /Ed./: PCR Strategies, Academic Press, London, Nagy-Britannia. 1995 írja le.

A *C. glutamicum* egy érdeklődésre számot tartó génjének izolálásához először génbankot létesítünk ebből a mikroorganizmusból pl. az *E. coli*-ban vagy adott esetben a *C. glutamicum*-ban is. Génbankok létrehozását általánosan leírják az ismert tan-
könyvek vagy kézikönyvek. Példaként a következőket említjük meg:

Winnacker, Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie, Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990

Sambrook et al. kézikönyve: Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Bathe et al., Molecular and General Genetics, 252, p. 255-265, 1996 a *C. glutamicum* ATCC 13032 egy génbankját írja le, amelyet a supercos I kozmidvektor segítségével /Wahl et al., Proc. Natl.Acad.Sci.USA 84, p. 2160-2164, 1987/ hoztak létre *E. coli* K-12 NM 554-ben /Raleigh et al., Nucleic Acid Res. 16, p. 1563-1575, 1988/.

Börmann et al., Molecular Microbiology 6(3), p. 317-326 ugyan-csak egy *C. glutamicum* ATCC 13032 génbankot ír le, amelyet a pHc79 kozmid alkalmazásával /Hohn és Collins, Gene 11, p. 291-298, 1980/ hoztak létre. A *C. glutamicum* egy génbankjának *E. coli*-ban való előállításához plazmidok is felhasználhatók, amilyen a pBR322 /Bolivar, Life Sciences, 25, p. 807-818, 1979/ vagy a pUC19 /Norrandar et al., Gene, 26, p. 101-106, 1983/. Ugyanígy alkalmazhatók az *E. coli*-ban és a *C. glutamicum*-ban replikálható inga vektorok is, amilyen pl. a pJC1 /Cremer et al., Molecular and General Genetics 220, p. 478-480, 1990/ vagy a pEC5 /Eikmanns et al., Gene 102, p. 93-98, 1991/. Gazdaszervezetként különösen alkalmasak azok a törzsek, amelyek a restrikció és/vagy a rekombináció szempontjából hibásak. Példa erre az *E. coli* DH5 α mc^r, amelyet Grant et al. ír le /Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 87, p. 4645-4649, 1990/. Egy másik példa a restrikció-deficiens *C. glutamicum* RM3 és RM4 törzs, amelyeket Schäfer et al. /Applied and Environmental Biology 60(2), p. 756-759, 1994/ ismertet.



A génbankot ezután egy indikátor törzsbe viszik be transzformációval /Hanahan, J.Mol.Biol. 166, p. 557-580, 1983/ vagy elektroporáció /Tauch et al., FEMS Microbiological Letters 123, p. 343-347, 1994/ segítségével. Az indikátor törzsre az a jellemző, hogy mutáció van jelen az érdeklődésre számot tartó génben, amely egy kimutatható fenotípushoz /pl. auxotrófiához/ vezethet. Az indikátor törzsek ill. mutánsok irodalmi forrásból vagy törzsgyűjteményekből /amilyen pl. a Yale University, New Haven, Connecticut, USA Genetic Stock Center-e/ beszerezhetők vagy adott esetben közvetlenül előállíthatók. Példa az ilyen indikátor törzsre a diaminopimelinsav-hiányos RDA8 E. coli törzs /Richaud et al., C.R.Acad.Sci.Paris Ser.III., 293, p. 507-512, 1981/, amely a *dapA* génben egy mutációt /*dapA:Mu*/ hordoz.

Az indikátor törzs rekombináns plazmiddal - amely az érdeklődésre számot tartó gént hordozza - való transzformációja és a gén expressziója után az indikátor törzs a megfelelő tulajdonság tekintetében prototróffá válik. Ha a klónozott DNS fragmentum rezisztenciát hordoz pl. egy antimetabolittal szemben (amilyen pl. az S-/2-amino-etil/-cisztein), a rekombináns plazmidot hordozó indikátor törzs megfelelő kiegészített táptalajon azonosítható lesz.

Ha az érdeklődésre számot tartó gén régió nukleotid szekvenciája ismert ill. egy adatbankból hozzáférhető, a kromoszomális DNS ismert módszerekkel - l. pl.: Eikmanns et al., Microbiology 140, p. 1817-1828, 1994 - izolálható és a szóban forgó gén a polimeráz láncreakcióval /PCR/ megfelelő primer alkalmazásával szintetizálható, majd megfelelő plazmid vektorba - ilyen pl. az



Invitrogen, Groningen, Hollandia cég pCRIITOP0 terméke - klónozható. A PCR metodikára vonatkozó összefoglalás Newton és Graham: PCR /Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Németország, 1994/ című könyvében található meg.

A nukleotid szekvenciával kapcsolatban nyilvánosan hozzáférhető adatbankként pl. az European Molecular Biologies Laboratories /EMBL, Heidelberg, Németország/ vagy a National Center for Biotechnology Information /NCBI, Bethesda, MD, USA/ említhető meg.

A *C. glutamicum* ATCC 13032 *lysE* génjének izolálását és klónozását, valamint a nukleotid szekvenciát a DE-A-195 48 222 sz. nyilvánosságra hozatali iratban írják le.

Különböző *C. glutamicum* törzsek *dapA* génjének izolálását, klónozását és szekvenálását a következő helyeken ismertetik: Cremer et al., Molecular and General Genetics 220, p. 478-480, 1990

Pisabarro et al., J.Bact. 175, p. 2743-2749, 1993 és

Bonnassie et al., Nucleic Acids Research 18, p. 6421, 1990.

A *dapA* gén nukleotid szekvenciája X53993 számon férhető hozzá.

A *Brevibacterium lactofermentum* törzs *dapB* génjének izolálását, klónozását és szekvenálását ismerteti Pisabarro et al., J.Bact. 175, p. 2743-2749, 1993.

A *dapB* gén nukleotid szekvenciája X67737 számon férhető hozzá.

A *lysC* allélek /amelyek egy feed back rezisztens aszpartát kináz gént kódolnak/ és a *lysC* gén izolálását, klónozását és szekvenálását több szerző ismerteti. Így Kalinowski et al.

/Molecular and General Genetics 224, p. 317-324, 1990/ a *C. glutamicum* DM58-1 *C. glutamicum* törzs *lysC* alléljét írja le. A DE-A-39 43 117 sz. nyilvánosságra hozatali irat a *C. glutamicum* MH20 törzs *lysC* alléljének klónozását írja le. Follettie et al. /J.Bact. 175, p. 4096-4103, 1993 a *C. flavum* N13 törzs *lysC* - „ask”-nak nevezett - alléljéről ír. Kalinowski et al. /Molecular Microbiol. 5, p. 1197-1204, 199/ a *C. glutamicum* ATCC 13032 *lysC* génjét ismerteti. A *lysC* gén és különböző *lysC* allélek nukleotid szekvenciája többek között az X57226 és E06826 számon szerezhető be.

Az ily módon kapott gének azután t.k. plazmid vektorokba, amilyen pl. a pJC1 /Cremer et al., Molecular and General Genetics 220, p. 478-480, 1990/ vagy a pEC5 /Eikmanns et al., Gene 102, p. 93-98, 1991/ építhetők be külön-külön vagy megfelelő kombinációkban; ezek beépíthetők a kiválasztott korineform baktérium törzsekbe, amilyen pl. az MH20-22B /Schrumpf et al., Applied Microbiol.Biotechnol. 37, p. 566-571, 1992/, transzformációval /l. pl.: Thierbach et al., Appl.Microbiol.Biotechnol. 29, p. 356-362, 1988/ vagy elektroporációval /l. pl.: Dunican és Shivnan, Bio/Technology 7, p. 1067-1070, 1989/, és expresszióra bírhatók. Ugyancsak lehetséges a kiválasztott törzs két plazmid vektorral- amelyek a kiválasztott gén/eket tartalmazzák - való transzformálása és ezen keresztül két vagy több gén előnyös, egyidejű, fokozott expressziójának kiváltása, a *lysE* gén ismert fokozásával együtt.

Ilyen törzsek pl. a következők:

az MH20-22B/pJC33/pEC7lyse törzs, amelynek esetében a lyse és a lysC gén egyidejűleg fokozottan exprimált,

az MH20-22B/pJC50/pEC7lyse törzs, amelynek esetében a lyse, a lysC és a dapA gén egyidejűleg fokozottan exprimált,

az MH20-22B/pJC23/pEC7lyse törzs, amelynek esetében a lyse és a dapA gén egyidejűleg fokozottan exprimált, vagy

az MH20-22B/pJC23/pEC7dapBlyse törzs, amelynek esetében a lyse, a dapA és a dapB gén egyidejűleg fokozottan exprimált.

A találmány szerint előállított mikroorganizmusok folyamatosan, szakaszosan, batch eljárással (egylépéses tenyésztés), feed batch eljárással (adagolós tenyésztés) vagy ismételt feed batch eljárással (ismételt adagolós tenyésztés) szaporíthatók az L-lizin termelése céljából. Az ismert tenyésztési módszerek összefoglalását pl. a következő helyek ismertetik:

Lehrbuch von Chmiel /Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik; G. Fischer Verlag, Stuttgart, 1991/ vagy

Lehrbuch von Storhas /Bioreaktoren und periphere Einrichtungen; Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994/.

Az alkalmazott tenyésztő közegnek kielégítő módon meg kell felelnie az aktuális mikroorganizmus igényeinek. Különböző mikroorganizmusok táptalajainak leírása kézikönyvekben /l. pl.: Manual of Methods for General Bacteriology, American Society for Bacteriology, Washington D.C., USA, 1981/ megtalálható.

Szénhidrát forrásként cukrok és szénhidrátok alkalmazhatók, pl. a következők: glukóz, szacharóz, laktóz, fruktóz, maltóz, melasz, keményítő és cellulóz, olajok és zsírok, amilyen pl. a

szójaolaj, napraforgóolaj, mogoróolaj és kókuszszsír; zsírsavak, amilyen pl. a palmitinsav, sztearinsav és linolsav; alkoholok, mint pl. a glicerín és az etanol és szerves savak, amilyen pl. az ecetsav. Ezek az anyagok külön-külön vagy keverékként alkalmazhatók.

Nitrogénforrásként a következők alkalmazhatók:

szerves nitrogént tartalmazó vegyületek, amilyen a pepton, élesztőkivonat, húskivonat, malátakivonat, kukorica-ekvár, szójaliszt és karbamid, vagy

szervetlen vegyületek, amilyen az ammónium-szulfát, ammónium-klorid, ammónium-foszfát, ammónium-karbonát és ammónium-nitrát.

A nitrogénforrások külön-külön vagy keverékként alkalmazhatók.

Foszfor forrásként kálium-dihidrogén-foszfát, dikálium-hidrogén-foszfát vagy a megfelelő nátrium tartalmú sók használhatók fel.

A táptalajnak tartalmaznia kell továbbá fémsókat, pl. magnézium-szulfátot vagy vas-szulfátot, amelyek a növekedéshez szükségesek.

Végül az előbbieket mellett adagolhatók esszenciális növekedési anyagok, így aminosavak és vitaminok.

Az említett adalékanyagok egyszeri adag alakjában vihetők be a tenyészetbe vagy megfelelő módon a tenyésztés közben adagolhatók.

A tenyészet pH értékének beállítására bázisos vegyületek (pl. nátrium-hidroxid, kálium-hidroxid, ammónia) vagy savas vegyületek (pl. foszforsav vagy kénsav) használhatók fel. A habképződés befolyásolására habzásgátló szerek, pl. zsírsav-poli-

glikol-észterek alkalmazhatók. A plazmidok stabilitásának megőrzésére adott esetben megfelelő szelektíven ható anyagokat, pl. antibiotikumokat adunk a táptalajhoz. Az aerób körülmények fenntartására oxigént vagy oxigént tartalmazó gázlegyeket, pl. levegőt vezetünk tenyészetbe. A tenyésztési hőmérséklet rendszerint 20-45°C, előnyösen 25-40°C. A tenyésztést addig folytatjuk, amíg maximális mennyiségű lizin nem képződik. Ezt a célt általában 10-160 óra alatt érjük el.

A keletkezett lizin koncentrációja aminosav-analizátorok segítségével, ioncserélő kromatográfiával és az oszlopról való ki lépést követően ninhidrines kimutatással /Spackmann et al., Anal.Chem.30, p. 1190, 1958/ határozható meg.

A DSMZ-nél /Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen; Braunschweig, Németország/ a következő mikroorganizmusokat helyeztük letétbe a Budapesti Szerződés szerint:

E. coli K-12 törzs, DH5 α /pEC7lysE DSM 12871

E. coli K-12 törzs, DH5 α /pEC7dapBlysE DSM 12875

Corynebacterium glutamicum törzs, DSM5715/pJC23 DSM 12869

Corynebacterium glutamicum törzs, DSM5715aecD::dapA(MA16) DSM 12867

Corynebacterium glutamicum törzs, DSM5715aecD::dapA(MC20) DSM 12869.

PÉLDÁK

1. példa

A lysE-t kódoló DNS előállítás

Az ATCC 13032 törzsből a szokásos módszerekkel /Eikmanns et al., Microbiology 140, p. 1817-1828, 1994/ kromoszomális DNS-t

izolálunk. A polimeráz láncreakció /PCR/ segítségével egy DNS fragmentumot, amely a *lysE* gént hordozza, amplifikálunk. A *lysE* gén *C. glutamicum*-ra ismert szekvenciája alapján /Vrijic et al., Molecular Microbiology 22(3), p. 815-826, 1996; letéti szám X96471/ a következő primer oligonukleotidokat választjuk ki a PCR-hez:

LysBam1:

5' CTC GAG AGC (GGA TCC) GCG CTG ACT CAC C 3'

LysBam2:

5' GGA GAG TAC GGC (GGA TCC) ACC GTG ACC 3'

A primereket az MWG Biotech cég (Ebersberg, Németország) szintetizálta; a PCR reakció Innis et al. (PCR Protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, 1990) standard PCR módszere szerint történt. A primerek lehetővé teszik a *lysE* gént hordozó kb. 1,1 kb méretű DNS fragmentum amplifikálását. A primerek ezenkívül tartalmazzák a BamHI restrikciós nukleáz hasítási helyének szekvenciáját, amelyet az előbbi nukleotid szekvenciában zárójellel jelöltünk.

A *lysE* gént hordozó, kb. 1,1 kb méretű amplifikált DNS fragmentumot elektroforézissel, 0,8%-os agaróz gélben azonosítjuk, a gélből elkülönítjük és a Quiagen cég (Hilden, Németország) QIAquick gélextrakciós kitje (katalógusszám 28704) segítségével tisztítjuk. Ezután következik a fragmentum ligálása a Boehringer Mannheim cég (Boehrigen, Németország) T4 DNS ligáza segítségével a pUC18 vektorba (Norrandar et al., Gene (26), p. 101-106, 1983). Ehhez a pUC18 gént a SmaI restrikciós endonukleázzal teljesen felhasítjuk és lúgos foszfátázzal (Boehringer Mannheim cég,

Boehringer, Németország) kezeljük. A ligációs elegyet a DH5 α E. coli törzsbe (Hanahan: DNA cloning. A practical approach. Vol.I., IRL Press, Oxford, Washington D.C., USA) transzformáljuk. A plazmid-hordozó sejtek szelekciója úgy történt, hogy a transzformációs elegyet 50 mg/l ampicillint tartalmazó LB agarra szélesztettük (Sambrook et al., Molecular Cloning: A laboratory manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA). A DNS plazmidot egy transzformánsból izoláljuk és a BamHI restrikciós enzimmel végzett kezeléssel, majd elektroforézissel vizsgáljuk. A plazmidot pUC18 lysE-nek neveztük el.

2. példa

A dapB előállítás

Az 1. példa szerint a Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 törzsből kromoszomális DNS-t izolálunk. A Corynebacterium glutamicum-ból származó dapB gén mint olyan szekvenciája ismert /letéti szám X67737/. Az ismertett DNS szekvencia mégis csak 56 bp terjedelmű részt - a transzlációs starttól számítva - magába. Ezért kiegészítésként szekvenáltuk a transzlációs start előtti 5' tartományt.

A szekvenálást a pJC25 plazmiddal /EP 435 132/ egy olyan primer oligonukleotid alkalmazásával végeztük, amely az ismert dapB szekvencia /letéti szám X67737/ tartományában kötődik. Az alkalmazott szekvenáló primer szekvenciája:

5' GAA CGC CAA CCT TGA TTC C 3'

A szekvenálást a Sanger et al. /Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74, p. 5463-5467, 1977/ által leírt lánc-megszakításos módszerrel végeztük. A szekvenálási reakciót az AutoRead Sequencing Kit (Pharmacia, Freiburg) segítségével végeztük. Az elektroforézises elemzést és a szekvenálási termékek kimutatását ugyanezen cég A.L.F. DNS-szekvenáló berendezése segítségével végeztük. A kapott DNS szekvenciát egy második primer kiválasztásához használtuk fel annak érdekében, hogy a transzkripció start előtti további szekvencia adatokhoz jussunk. Ehhez a következő primert alkalmaztuk:

5' CTT TGC CGC CGT TGG GTT C 5'.

A szekvenálási reakciót a fent leírt módon végeztük. A dapB géntől felfelé elhelyezkedő új szekvenciát SEQ ID No. 1-gyel jelöltük. A dapB gén nukleotid szekvenciáját magában foglaló szekvenciát SEQ ID No. 2-vel jelöltük.

A dapB gént polimeráz láncreakció segítségével amplifikáltuk. Erre a célra a MWG Biotech cég két primer oligonukotidot szintetizált, amelyeket a dapB gén ismert DNS szekvenciája alapján választottunk ki:

P-dap:

5' (AAG CTT) AGG TTG TAG GCG TTG AGC 3'

dapall:

5' TTA ACT TGT TCG GCC CGT ACA GC 3'.

Az 5' primer (primer P-dap) egy HindIII hasítási helyet tartalmaz (ezt az előbbi szekvenciában zárójelekkel jelöltük). A PCR-t az 1. példa szerint végeztük. Ily módon egy kb. 1,1 kb méretű DNS-fragmentumot amplifikáltunk, amely a dapB gént hordozza

és egyik végén hasítási helyet tartalmaz a HindIII restrikciós endonukleáz számára. A kapott PCR fragmentumot 0,8%-os agaróz gélből tisztítjuk (QIAquick Gel Extraction kit, Qiagen cég, Hilden, Németország) és a TOPO TA Cloning kit (Invitrogen, Leek, Hollandia; katalógusszám K4550-01) segítségével a pCR2.ITOPO klónozó vektorba (Invitrogen, Leek, Hollandia) klónozzuk. A ligációs elegyet az E. coli TOP10F' törzsbe (Invitrogen cég) transzformáljuk. A transzformációs elegyet 50 mg/l kanamicint tartalmazó LB agaron - 0,16 mM IPTG, 64 mg/l X-gal - szélesztjük és izoláljuk a kanamicin rezisztens fehér színű telepeket. A plazmid DNS-t egy transzformánsból különítjük el QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen cég) segítségével és HindIII enzimmel végzett restrikciós hasítással, majd agaróz gél elektroforézissel vizsgáljuk. Az amplifikált DNS fragmentum DNS szekvenciáját szekvenálás segítségével határozzuk meg. A PCR termék szekvenciája azonos a SEQ ID No. 1. sz.-on bemutatottal. A kapott plazmidot pCR2.ITOPOdapB-nek neveztük el.

3. példa

A lysE klónozása a pEC7 vektorban

A pUC18lysE plazmidból /1. példa/ a lysE-t hordozó fragmentumot a következők szerint a pEC7 vektorba inszertáljuk. A pEC7 gén alapját az E. coli - C. glutamicum pEC5 komp vektor képezi /Eikmanns et al., Microbiology 102, p. 93-98, 1991/. A pEC5 plazmidból a következők szerint eltávolítjuk azokat a BamI hasítási helyeket, amelyeknek nincs helyük a polilinkerben. A pEC5 plazmidot részlegesen hasítjuk a BamHI restrikciós enzimmel. A

kb. 7,2 kb méretű DNS fragmentumot elkülönítjük az agaróz gélből és a túlnyúló végeket feltöltjük a Klenow polimerázzal (Boehringer Mannheim). Az így kapott DNS fragmentumot ligáljuk (T4 ligáz, Boehringer Mannheim). A ligációs elegyet az *E. coli* DH5 α törzsbe transzformáljuk és 50 mg/l kanamicint tartalmazó LB agarról elkülönítjük a kanamicin rezisztens telepeket. Egy transzformánsból elkülönítjük a plazmid DNS-t (QIAprep Spin Miniprep kit, Qiagen cég), majd BamHI és PstI restrikciós enzimmel végzett hasítással vizsgáljuk. Az így kapott plazmidot pEC6-nak nevezzük.

A pEC6 plazmidot XhoI restrikciós enzimmel teljesen elbontjuk. Egy DNS fragmentumot, amely a *trp* terminátort hordozza, a vektor DNS fragmentummal ligálunk (T4 ligáz, Boehringer Mannheim). A ligációs elegyet az *E. coli* DH5 α törzsbe transzformáljuk és 50 mg/l kanamicint tartalmazó LB agarról elkülönítjük a kanamicin rezisztens telepeket. Egy transzformánsból elkülönítjük a plazmid DNS-t (QIAprep Spin Miniprep kit, Qiagen cég), majd BamHI és PstI restrikciós enzimmel végzett hasítással vizsgáljuk. Az így kapott plazmidot pEC6-nak nevezzük.

A pEC6 plazmidot XhoI restrikciós enzimmel teljesen elbontjuk. Egy DNS fragmentumot, amely a *trp* terminátort hordozza, a vektor DNS fragmentummal ligálunk (T4 ligáz, Boehringer Mannheim). A ligációs elegyet az *E. coli* DH5 α törzsbe transzformáljuk és 50 mg/l kanamicint tartalmazó LB agarról elkülönítjük a kanamicin rezisztens telepeket. Egy transzformánsból elkülönítjük a plazmid DNS-t /QIAprep Spin Miniprep kit, Qiagen cég/, majd BamHI és

PstI restrikciós enzimmel végzett hasítással vizsgáljuk. Az így kapott plazmidot pEC6-nak nevezzük.

A pEC6 plazmidot XhoI restrikciós enzimmel teljesen elbontjuk. Egy DNS fragmentumot, amely a trp terminátort hordozza, a vektor DNS fragmentummal ligálunk (T4 DNS ligáz, Boehringer Mannheim). A ligációs elegyet az E. coli DH5 α törzsbe transzformáljuk és 50 mg/l kloramfenikolt tartalmazó LB agarról elkülönítjük a kloramfenikolra rezisztens telepeket. Egy transzformánsból elkülönítjük a plazmid DNS-t (QIAprep Spin Miniprep kit, Qiagen cég), majd BamHI és XhoI restrikciós enzimmel végzett hasítással vizsgáljuk. Az így kapott plazmidot pEC7-nak nevezzük.

Az 1. példában leírt pUC18lyse plazmidot a BamHI restrikciós enzimmel teljesen elbontjuk és a lyse gént tartalmazó 1,1 kb nagyságú fragmentumot az 1. példa szerint elkülönítjük. Ugyanígy a pEC7 vektort teljesen elbontjuk a BamHI restrikciós enzimmel és lúgos foszfatázzal kezeljük. A BamHI vektor fragmentumot és a BamHI lyse fragmentumot ligáljuk (Rapid DNA Ligation kit, Boehringer Mannheim) és az E. coli DH5 α törzsbe transzformáljuk. A plazmidot hordozó transzformánsokat 10 mg/l kloramfenikolt tartalmazó LB agaron szelektáljuk. Elkülönítjük a plazmid DNS-t (QIAprep Spin Miniprep kit, Qiagen cég), majd BamHI restrikciós enzimmel végzett hasítással vizsgáljuk. Az így kapott plazmidot pEC7lyse plazmid-nak nevezzük (1. ábra). A pEC7lyse plazmid E. coli DH5 α törzsbe való transzformálásával kapott törzset DH5 α /pEC7lyse-nek nevezzük.

4. példa

A dapB klónozása a pEC7 vektorban

A pCR2.ITOPOdapB plazmidból /2. példa/ izolálunk egy kb. 1,1 kb méretű DNS fragmentumot, amely a dapB gént hordozza. A pCR2.ITOPOdapB plazmidot ehhez a HindIII restrikciós enzimmel teljesen elbontjuk és a dapB gént hordozó kb. 1,1 kb méretű DNS fragmentumot izoláljuk. Az így kapott - a dapB-t hordozó - DNS fragmentumot a pEC7 vektorral (3. példa) ligáljuk (T4 DNS ligáz, Boehringer Mannheim), amelyet ugyancsak HindIII restrikciós enzimmel teljesen elbontottunk és lúgos foszfátazzal (Boehringer Mannheim) kezeltünk. A ligációs elegyet az E. coli DH5 α törzsbe transzformáljuk és 50 mg/l kanamicint tartalmazó LB agaron izoláljuk a kanamicin rezisztens telepeket. Egy transzformánsból elkülönítjük a plazmid DNS-t (QIAprep Spin Miniprep kit, Qiagen cég), majd HindIII restrikciós enzimmel végzett restrikciós hasítással vizsgáljuk. Az így kapott plazmidot pEC7dapB plazmidnak nevezzük (2. ábra). A plazmid E. coli DH5 α törzsbe való transzformálásával kapott törzset DH5 α /pEC7dapB-nek nevezzük.

5. példa

A dapB-t és Lysⁱ klónozása a pEC7 vektorban

A pCR2.ITOPOdapB plazmidból /2. példa/ izolálunk egy kb. 1,1 kb méretű DNS fragmentumot, amely a dapB gént hordozza. A pCR2.ITOPOdapB plazmidot ehhez a HindIII restrikciós enzimmel teljesen elbontjuk és a dapB gént hordozó kb. 1,1 kb méretű DNS fragmentumot izoláljuk. Az így kapott - a dapB-t hordozó - DNS fragmentumot a pEC7 vektorral (3. példa) ligáljuk (T4 DNS ligáz,

Boehringer Mannheim), amelyet ugyancsak HindIII restrikciós enzimmel teljesen elbontottunk és lúgos foszfatázzal (Boehringer Mannheim) kezeltünk. A ligációs elegyet az *E. coli* DH5 α törzsbe transzformáljuk és 50 mg/l kanamicint tartalmazó LB agaron izoláljuk a kanamicin rezisztens telepeket. Egy transzformánsból elkülönítjük a plazmid DNS-t (QIAprep Spin Miniprep kit, Qiagen cég), majd BamHI restrikciós enzimmel végzett hasítással vizsgáljuk. Az így kapott plazmidot pEC7lysE plazmid-nak nevezzük /1. ábra/. A pEC7lysE plazmid *E. coli* DH5 α törzsbe való transzformálásával kapott törzset DH5 α /pEC7lysE-nek nevezzük.

4. példa

A dapB klónozása a pEC7 vektorban

A pCR2.ITOPOdapB plazmidból (2. példa) izolálunk egy kb. 1,1 kb méretű DNS fragmentumot, amely a *dapB* gént hordozza. A pCR2.ITOPOdapB plazmidot ehhez a HindIII restrikciós enzimmel teljesen elbontjuk és a *dapB* gént hordozó kb. 1,1 kb méretű DNS fragmentumot izoláljuk. Az így kapott - a *dapB*-t hordozó - DNS fragmentumot a pEC7 vektorral /3. példa/ ligáljuk (T4 DNS ligáz, Boehringer Mannheim), amelyet ugyancsak HindIII restrikciós enzimmel teljesen elbontottunk és lúgos foszfatázzal (Boehringer Mannheim) kezeltünk. A ligációs elegyet az *E. coli* DH5 α törzsbe transzformáljuk és 50 mg/l kanamicint tartalmazó LB agaron izoláljuk a kanamicin rezisztens telepeket. Egy transzformánsból elkülönítjük a plazmid DNS-t (QIAprep Spin Miniprep kit, Qiagen cég), majd HindIII restrikciós enzimmel végzett hasítással vizsgáljuk. Az így kapott plazmidot pEC7dapB plazmid-nak nevezzük

(2. ábra). A plazmid *E. coli* DH5 α törzsbe való transzformálásával kapott törzset DH5 α /pEC7dapB-nek nevezzük.

5. példa

A dapB-t és a lysE-t egyidejűleg tartalmazó plazmid előállítása

A pCR2.ITOP0dapB plazmidból, amely a *C. glutamicum* ATCC 13032-ből származó dapB gént tartalmazza, HindIII fragmentuként elkülönítjük a dapB gént. A plazmidot e célból teljesen elbontjuk a HindIII enzimmal és 0,8%-os agaróz gélből elkülönítjük a dapB-t hordozó DNS fragmentumot (QIAprep Spin Miniprep kit, Qiagen cég, Hilden, Németország). A HindIII restrikciós enzimmal ezenkívül teljesen elbontjuk és lúgos foszfatázzal kezeljük a pEC7 vektort (3. példa). Az így kapott lineáris vektor fragmentummal ligáljuk az 1,1 kb méretű dapB-t tartalmazó DNS fragmentumot (T4 DNS ligáz, Boehringer Mannheim), és a ligációs elegyet az *E. coli* DH5 α törzsbe transzformáljuk. A plazmidot hordozó transzformánsokat 10 mg/l kloramfenikolt tartalmazó LB agaron szelektáljuk. Elkülönítjük a plazmid DNS-t (QIAprep Spin Miniprep kit, Qiagen cég, Hilden, Németország) és a HindIII restrikciós enzimmal végzett restrikciós hasítással vizsgáljuk.

Az így kapott plazmidot pEC7lysEdapB-nek nevezzük. Ez a plazmid az *E. coli*-ban és a *C. glutamicum*-ban autonóm módon replikálható és a gazdaszervezetnek rezisztenciát kölcsönöz a kloramfenikol antibiotikummal szemben. A pEC7lysEdapB plazmid, mint ezt a 3. ábrán bemutatjuk, egyidejűleg tartalmazza a dapB gént - amely a dihidropikolinát reduktázt kódolja - és a lysE

gént, amely a lizin-exportert kódolja. Az *E. coli* DH5 α törzs pEC7lysEdapB-vel való transzformálása eredményeként kapott törzset DH5 α /pEC7lysEdapB-nek nevezzük.

6. példa

Az MH20-22B törzs transzformálása pJC1, pJC33 és pJC50 plazmiddal

A pJC1 plazmid az *E. coli*-ban és a *C. glutamicum*-ban replikálható (Cremer et al., Molecular and General Genetics, 220, p. 478-480, 1990). Ebből vezethető le a pJC33 plazmid [Cremer et al., Applied and Environmental Microbiol. 57(6), p. 1746-1752], amely hordozza a *C. glutamicum* MH20-22B-ből származó lysC(Fbr) gént.

A pJC50 plazmid alapját ugyancsak a pJC1 vektor képezi és ez a plazmid hordozza a *C. glutamicum* MH20-22B-ből származó LysC(Fbr) gént és a *C. glutamicum* ATCC 13032-ből származó dapA gént (DE-A-39 43 117).

A pJC1, pJC33 és pJC50 plazmidot elektroporációs módszerrel [Haynes és Britz, FEMS Microbiol.Letters (61), p. 329-334, 1989] bevittük a *C. glutamicum* MH20-22B törzsbe. Ez a törzs AEC rezisztens lizin-termelő, amelyet DSM5715 számon helyeztünk letétbe.

Az elektroporáció segítségével kapott transzformánsokat szelekciós agaron (LBHIS agar):

18,5 g/l agy-szív infúziós húsleves

0,5M szorbit

5 g/l bakto-tripton

2,5 g/l bakto-élesztőkivonat

5 g/l NaCl

15 mg/l kanamicin

izoláltuk. A plazmid DNS-t szokásos módon (Peters-Wendisch et al., Microbiology 144, p. 915-927, 1998) elkülönítettük, megfelelő restrikciós endonukleázokkal elbontottuk és vizsgáltuk. A kapott törzseket a következőképpen neveztük el: MH20-22B/pJC1, MH20-22B/pJC33 és MH20-22B/pJC50.

7. példa

Transzformáció a pEC7lyse és a pEC7dapBlyse plazmiddal

A továbbiakban a 6. példa szerint előállított törzseket alkalmaztuk egy második plazmid bevitele céljából.

Az említett törzsekbe (MH20-22B/pJC1, MH20-22B/pJC33 és MH20-22B/pJC50) elektroporációs módszerrel vittük be a pEC7lyse és a pEC7dapBlyse plazmidot.

A transzformált baktériumokat a kapott plazmidok antibiotikum rezisztenciája alapján szelektáltuk. Az elektroporáció segítségével kapott transzformánsokat szelekciós agaron (LHBIS agar):

15 mg/l kanamicin

7,5 mg/l kloramfenikol

izoláltuk. Elkülönítettük a plazmid DNS-t, ezt megfelelő restrikciós endonukleázzal hasítottuk és vizsgáltuk.

8. példa

Lizin előállítása

A 7. példa szerint kapott különböző *C. glutamicum* törzseket és a felülúszóban meghatározzuk a lizin tartalmat.

A különböző törzseket először a megfelelő antibiotikumokat (kanamicin 25 mg/l, kloramfenikol 10 mg/l) tartalmazó agar lemezen (agy-szív agar) 24 órán át 33°C-on inkubáljuk. Ezekből az agar lemez tenyészetekből kiindulva beoltottunk egy előtenyészetet (10 ml táptalaj 100 ml-es Erlenmeyer lombikokban). Az előtenyészet táptalajaként CgIII teljes táptalajt alkalmaztunk, amelyhez kanamicint (25 mg/l) és kloramfenikolt (10 mg/l) adtunk. Az előtenyészetet 24 órán át 33°C-on 240 ford./perc sebességű rázógépen inkubáljuk. Ebből az előtenyészetből beoltunk egy főtenyészetet úgy, hogy a főtenyészet kezdeti OD értéke /660 nm/ 0,2 legyen. A főtenyészethez az MM táptalajt alkalmazzuk:

kukoricalekvár	5 g/l
MOPS	20 g/l
glukóz	50 g/l (külön autoklávozva)
sók:	
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,0 g/l
CaC ₁₂ ·2H ₂ O	10 mg/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg/l
MnSO ₄ ·H ₂ O	5 mg/l
biotin	0,3 mg/l (sterilre szűrve)
tiamin·HCl	0,2 mg/l (sterilre szűrve)
CaCO ₃	25 g/l

A kukoricalekvár, MOPS és a sóoldat keverékének pH-ját ammóniás vízzel 7-re állítjuk be és az elegyet autoklávozzuk. Ezután hozzáadjuk a steril szubsztrát és vitamin oldatot, valamint a szárazon autoklávozott CaCO₃-at.

A tenyésztést 10 ml-es térfogatban végezzük 100 ml-es tere-
lőlapos Erlenmeyer lombikokban, 25 mg/l kanamicin és 10 mg/l
kloramfenikol hozzáadása mellett. A tenyésztést 33°C-on és 80%
levegő nedvesség tartalom mellett végezzük.

48 óra múlva 660 nm mérő hullámhosszúságon Biomek 1000 se-
gítségével (Beckmann Instruments GmbH, München) meghatározzuk az
OD értéket. A keletkezett lizin mennyiségét aminosav analizátor-
ral (Eppendorf-BioTronik, Hamburg, Németország), ioncserélő kro-
matográfiával és az oszlop utáni származék képzéssel és
ninhidrines kimutatással határozzuk meg. A glukóz tartalmat a
Skalar Analytik GmbH (Erkelenz, Németország) cukor elemzőjével
határozzuk meg.

A kísérlet eredményeit az 1. táblázatban mutatjuk be.

1. Táblázat

Törzs	Gén	OD (660)	Lizin-HCl g/l
DSM5715/pJC1/pEC7lyse	lyse	9,1	11,1
DSM5715/pJC33/pEC7lyse	lyse, lysC	8,7	12,2
DSM5715/pJC50/pEC7lyse	lyse, lysC, dapA	9,1	12,7
DSM5715/pJC23/pEC7lyse	lyse, dapA	10,2	13,3
DSM5715/pJC23/pEC7dapBlyse	lyse, dapA, dapB	10,9	15,4

9. példa*Az aecD gén klónozása a pUC18 vektorban*

A pSIR21 plazmidot (Rossol, Dissertation, Universität Bielefeld, 1992) a BglIII és EcoRV enzimekkel teljesen elbontjuk és az 1,4 kb méretű DNS fragmentumot, amely a *C. glutamicum* ATCC 13032-ből származó aecD gént hordozza - letéti szám: M89931; Rossol and Pühler, J.Bact. 174(9), p. 2968-2977, 1992 -, elkülönítjük. Az elkülönített DNS fragmentumot a pUC18 plazmiddal - amelyet a BamHI és SmaI enzimekkel teljesen elbontottunk - a T4 DNS-ligáz segítségével a Sambrook et al. által leírt módon (Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) ligáljuk. A ligációs elegyet az *E. coli* DH5α törzsbe transzformáljuk. A transzformánsok szelekcióját 100 mg/l ampicillint tartalmazó agy-szív agaron végeztük. Egy telepből izoláltuk a plazmid-DNS-t. A kapott plazmidot pUC18::aecD-nek neveztük el.

10. példa*A dapA gén klónozása a pSP72 plazmidban*

A pJC20 plazmidból SphI-BamHI fragmentumként izolálunk egy dapA génfragmentumot (Cremer, J. Dissertation 1989, Universität Düsseldorf). A pSP72 vektort (Promega Corporation, AEÁ) az SphI és BamHI enzimekkel teljesen elbontjuk és lúgos foszfátazzal kezeljük. A dapA-t hordozó fragmentumot a T4-DNS ligáz segítségével ebbe a vektorba ligáljuk. A DNS-t az *E. coli* XL1 törzsbe [Bullock et al., BioTechniques (5), p. 376-379, 1987] transzformáljuk. A transzformánsok szelekcióját 100 mg/l ampicillint tar-

talmazó LB táptalajon végezzük. Egy transzformánsból elkülönítjük a plazmid-DNS-t, amelyet pSP72::dapA-val jelölünk.

11. példa

A dapA promóter mutagenézise; a pSP72::dapA(MC20) és a pSP72::dapA(MA16) plazmid előállítás

A promóter tartomány mutagenéziséhez a Stratagene cég „quickchange site directed” mutagenézis készletét alkalmazzuk. A rendelkezésre álló dapA szekvencia alapján a következő primereket állítjuk elő és alkalmazzuk a mutagenézishez:

A pSP72::dapA(MC20) előállításához:

primer dap1 a MC20-hoz:

CCA AAT GAG AGA TGG TAA CCT TGA ACT CTA TGA GCA

primer dap2 a MC20-hoz:

GTG CTC ATA GAG TTC AAG GTT ACC ATC TTC CCT CAT TTG G

A pSP72::dapA(MC16) előállításához:

primer dap 3 a MA16-hoz:

CCA AAT GAG GGA AGA AGG TAT AAT TGA ACT CTA TGA GCA

primer dap4 a MA16-hoz:

GTG CTC ATA GAG TTC AAT TAT ACC TTC TTC CCT CAT TTG G

A PCR reakciót az előállító Stratagene cég „quickchange site directed” mutagenézis készletével kapcsolatban megadott módon, (a 10. példa szerinti) pSP72::dapA plazmid templátként való alkalmazásával hajtjuk végre.

A következő lépés a mutagenézis reakcióelegy transzformációja az E. coli XL1-Blue törzsbe. A transzformánsok szelektálását 100 mg/l karbenicillint tartalmazó LB táptalajon végeztük. Egyik

transzformánsból izoláljuk a plazmid-DNS-t, és BstEII-vel való elbontással ellenőrizzük a BstEII hasítási hely kiesését. Azok a plazmidok, amelyek már nem hordoznak BstEII hasítási helyet, a kívánt mutációnak felelnek meg.

A kapott plazmidokat a *dapA* hiányos *E. coli* RDA8 mutánsba transzformáljuk. A transzformációs elegyeket 100 mg/l karbenicillint tartalmazó LB táptalajra szélesztjük, a *dapA* mutáció teljességének vizsgálatára. Egy-egy transzformánsból DNS-t különítünk el; a kapott plazmidokat pSP72::*dapA*(MC20)-nek és pSP72::*dapA*(MA16)-nek nevezzük. A plazmidokat ezután szekvenáljuk, a reverz és az univerzális szekvenáló primer alkalmazásával, a Sanger et al. (Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74, p. 5463-5467, 1977) által leírt lánc-hasításos eljárás szerint. A szekvenálási reakciót az AutoRead Sequencing készlet (Pharmacia, Freiburg) segítségével végezzük. A szekvenálási termékek elektroforézises elemzését és kimutatását a Pharmacia, Freiburg A.L.F. DNS szekvenáló berendezésével végezzük.

12. példa

*A pK19mobsacBaecD::*dapA*(MC20) és a pK19mobsacBaecD::*dapA*(MA16) plazmid előállítás (a mutagenézisen átesett fragmentumok át-klónozása)*

A 11. példa szerinti pSP72::*dapA*(MC20) és pSP72::*dapA*(MA16) plazmidot a PvuII és SmaI restriktációs enzimmel teljesen elbontjuk. A 1450 bp nagyságú PvuII-SmaI fragmentumokat, amelyek a *dapA* gént, az MC20 ill. MA16 mutált promóterrel, hordozzák, a T4-DNS ligázzal a StuI -gyel elbontott pUC18::aecD vektorba /a

9. példából/ ligáljuk. A ligációs elegyet az *E. coli* DH5 α törzsbe transzformáljuk. A transzformánsok szelekcióját 100 mg/l ampicillint tartalmazó LB táptalajon végeztük. Egy-egy transzformánsból izoláltuk a plazmid-DNS-t. Ily módon kapjuk a pUC18aecD::dapA(MC20) és a pUC18aecD::dapA(MA16) plazmidot.

A pUC18aecD::dapA(MC20) és a pUC18aecD::dapA(MA16) plazmidot az EcoRI restrikciós enzimmel részlegesen és az SalI enzimmel teljesen elhasítjuk, a 3,0 kb méretű aecD::dapA(MC20)-t ill. a aecD::dapA(MA16)-ot hordozó fragmentum előállítására. A fragmentumot a T4 ligáz segítségével az elbontott és lúgos foszfátazzal kezelt pK19mobsacB vektorba (Schäfer et al., Gene 145, p. 69-73, 1994) ligáljuk. A ligációs elegyet az *E. coli* DH5 α törzsbe transzformáljuk (Hanahan: DNA cloning. A practical approach. Vol. I., 1985. IRL-Press, Oxford, Washington D.C., AEÁ). A transzformánsok szelekcióját 50 mg/l kanamicint tartalmazó LB táptalajon végeztük. Egy-egy transzformánsból izoláltuk a plazmid-DNS-t. Ily módon kapjuk a pK19mobsacBaecD::dapA(MC20) és a pK19mobsacBaecD::dapA(MA16) plazmidot.

A plazmid DNS-t az *E. coli* S17-1 törzsbe /Simon et al., Bio/Technology 1, p. 784-791, 1983/ transzformáljuk. A transzformánsok szelekcióját 50 mg/l kanamicint tartalmazó LB táptalajon végezzük. Egy-egy transzformánsból plazmid-DNS-t különítünk el és ezt vizsgáljuk. A kapott törzseket S17-1/pK19mobsacBaecD::dapA(MC20)-nak és S17-1/pK19mobsacBaecD::dapA(MA16)-nak nevezzük.

13. példa

A *C. glutamicum* DSM5715aecD::dapA(MC20) és DSM5715aecD::dapA(MA16) törzs előállítása

A pK19mobsacBaecD::dapA(MC20) és pK19mobsacBaecD::dapA(MA16) - plazmidot konjugációs módszerrel (Schäfer et al., J.Bact. 172, p. 1663-1666, 1990) visszük át a 12. példa szerinti S17-1/pK19mobsacBaecD::dapA(MC20)-ból és S17-1/pK19mobsacBaecD::dapA(MA16)-ból a *C. glutamicum* DSM5715 törzsbe. A transzkonjugánsok szelekciójához a konjugációs elegyeket nalidixsavat és kanamicint tartalmazó agy-szív táptalajra szélesztjük. A kapott transzkonjugánsokat egy éjjelen át 10 ml agy-szív táptalajban inkubáljuk. Végül alikvotokat szélesztünk 10% szacharózt tartalmazó agy-szív agaron a szacharóz-érzékenység csökkenésére vonatkozó szelektálás érdekében. Szacharóz rezisztens klónokat izolálunk és vizsgálunk kloramfenikolt és kanamicint tartalmazó agarlemezeken (agy-szív agar, 15 mg/l kanamicin és 10 mg/l kloramfenikol).

A következő fenotípusú telepeket izolálunk:

szacharóz rezisztens

kanamicin érzékeny

kloramfenikol érzékeny.

A dapA génfragmentum inszercióját az aecD génbe a Southern Blot módszerrel, a Sambrook et al. által leírt módon (Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) ellenőrizzük.

14. példa*A C. glutamicum*

DSM5715aecD::dapA (MC20)/pEC7lysE,

DSM5715aecD::dapA(MA16)/pEC7lysE,

DSM5715aecD::dapA(MC20)/pEC7, DSM5715aecD::dapA(MA16)/pEC7

és DSM5715/pEC7

törzsek előállítás.

A lysE gén - a 3. példában leírt módon - a pEC7 vektorban van jelen. Ezt a pEC7lysE plazmidot, valamint pEC7 plazmidot elektroporáció (Haynes, FEMS Microbiol.Letters 61, p. 329-334, 1989) segítségével visszük be a

DSM5715aecD::dapA(MC20), DSM5715aecD::dapA(MA16) és

DSM5715 (a 13. példából)

DSM5715aecD::dapA(MC20)/pEC7lysE,

DSM5715aecD::dapA(MA16)/pEC7lysE,

DSM5715aecD::dapA(MC20)/pEC7, DSM5715aecD::dapA(MA16)/pEC7

és DSM5715/pEC7

törzsbe és így a következő *C. glutamicum* törzseket kapjuk:

DSM5715aecD::dapA (MC20)/pEC7lysE,

DSM5715aecD::dapA(MA16)/pEC7lysE,

DSM5715aecD::dapA(MC20)/pEC7,

DSM5715aecD::dapA(MA16)/pEC7 és

DSM5715/pEC7.

A transzformánsok szelekcióját 25 mg/l kanamicint tartalmazó agy-szív táptalajon végeztük. Egy - egy transzformánsból izoláltuk és vizsgáltuk a plazmid-DNS-t.

Ily módon kapjuk a következő törzseket:

DSM5715aecD::dapA (MC20)/pEC7lysE,

DSM5715aecD::dapA(MA16)/pEC7lysE,

DSM5715aecD::dapA(MC20)/pEC7,

DSM5715aecD::dapA(MA16)/pEC7 és

DSM5715/pEC7.

15. példa

Lizin előállítás a 14. példa szerint előállított törzsekkel

A következő törzseket:

DSM5715aecD::dapA (MC20)/pEC7lysE,

DSM5715aecD::dapA(MA16)/pEC7lysE,

DSM5715aecD::dapA(MC20)/pEC7,

DSM5715aecD::dapA(MA16)/pEC7 és

DSM5715/pEC7

a 8. példában leírt módon CgIII [Kase-Nakayma, Agricult. Biol. Chem. 36(9), p. 1611-1621, 1972] táptalajban előtenyésztjük, majd MM termelő közegben tenyésztjük. 48 órás inkubálás után 660 nm-en meghatározzuk az optikai sűrűséget (OD) és a keletkezett L-lizin koncentrációját.

A kísérlet eredményeit a 2. táblázatban mutatjuk be.

2. Táblázat

Törzs	OD	lizin.HCl, g/l
DM5715aecD::dapA(MC20)/pEC7lyse	13,3	13,8
DM5715aecD::dapA(MA16)/pEC7lyse	12,4	14,3
DM5715/pEC7	13,3	11,5
DM5715aecD::dapA(MA16)/pEC7	13,3	12,9
DM5715aecD::dapA(MC20)/pEC7	14,0	12,8

SZEKVENCIAPROTOKOLL

<110> Degussa-Hüls AG
 Forschungszentrum Jülich GmbH

<120> L-Lizint termelő korineform baktériumok és eljárás
 L-lizin előállítására

<130> 990058 BT

<140>
 <141>

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
 <211> 795
 <212> DNA
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>
 <221> -35_signal
 <222> (774)..(779)

<220>
 <223> DNA dapB-től felfelé

<400> 1
 ctgcagcaat gagaccgagt aatttcgggg ttgaccagat acaccaatga gaacttggga 60
 acggggttca aaaatactgg tgaagttgat gtcttcaaca atgcctgcac caggatatga 120
 tccggtatcg atacctggaa cgacaacctg atcaggatat ccagtgcctt gaatttgac 180
 gttgaggaag gaatcaccag ccattctcaac tgaagacctg gacgcctgct gaattggatc 240
 agtggcccaa tcgacccacc aaccagggtg gccattaccg gcgatatcaa aaacaactcg 300
 tgtgaacggt tcgtgctcgg caacgcggat gccagcgatc gacatatcgg agtcaccaac 360
 ttgagcctgc tgcttctgat ccattcgacg ggaacccaac ggcggaag cagtggggga 420
 aggggggagt ttggtgcact ctgaaccgag tgggtctctga agtggtaggc gacggggcag 480
 ctattctgaag gcgtgcgagt tgtggtgacc gggtagcggt tttcagtttc tgtcacaact 540
 ggagcaggac tagcagaggt tgtaggcgtt gagccgcttc catcacaagc acttaaaagt 600
 aaagaggcgg aaaccacaag cgccaaggaa ctactgcgga acgggcggtg aaggggcaact 660
 taagtctcat atttcaaaca tagttccacc tgtgtgatta atccctagaa cggaacaaac 720
 tgatgaacaa tcgttaacaa cacagaccaa aacggtcagt taggtatgga tatcagcacc 780
 ttctgaacgg gtacg 795

<210> 2
 <211> 1815
 <212> DNA
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>
 <221> -35_signal
 <222> (774)..(779)

<220>
 <221> -10_signal
 <222> (798)..(803)

<220>
 <221> CDS
 <222> (851)..(1594)

<400> 2
 ctgcagcaat gagaccgagt aatttcgggg ttgaccagat acaccaatga gaacttggga 60

acgggcttca	aaaatactgg	tgaagttgat	gtcttcaaca	atgcctgcac	caggatatga	120
tccggatatcg	atacctggaa	cgacaacctg	atcaggatat	ccagtgccctt	gaatattgac	180
gttgaggaag	gaatcaccag	ccatctcaac	tggaagacct	gacgcctgct	gaattggatc	240
agtggcccaa	tcgaccacc	aaccagggtg	gccattaccg	gcgatatcaa	aaacaactcg	300
tgtgaacggt	tcgtgctcgg	caacgcggat	gccagcgatc	gacatatcgg	agtcaccaac	360
ttgagcctgc	tgcttctgat	ccatcgacgg	ggaacccaac	ggcggcгаааg	cagtgggggga	420
aggggggagt	ttggtgcact	ctgaaccgag	tggtctctga	agtggtaggc	gacggggcag	480
ctatctgaag	gcgtgcgagt	tgtggtgacc	gggttagcgg	tttcagtttc	tgtcacaact	540
ggagcaggac	tagcagaggt	tgtaggcggt	gagccgcttc	catcacaagc	acttaaaagt	600
aaagaggcgg	aaaccacaag	cgccaaggaa	ctactgcgga	acgggcgggtg	aaggggcaact	660
taagtctcat	atttcaaaca	tagttccacc	tgtgtgatta	atccctagaa	cggaacaaac	720
tgatgaacaa	tcgttaacaa	cacagaccaa	aacggtcagt	taggtatgga	tatcagcacc	780
ttctgaacgg	gtacgtctag	actggtgggc	gtttgaaaaa	ctcttcgccc	cacgaaaatg	840
aaggagcata	atg gga atc aag gtt ggc gtt ctc gga gcc aaa ggc cgt	889				
Met Gly Ile Lys Val Gly Val Leu Gly Ala Lys Gly Arg						
1	5	10				
gtt ggt caa act att gtg gca gca gtc aat gag tcc gac gat ctg gag	937					
Val Gly Gln Thr Ile Val Ala Ala Val Asn Glu Ser Asp Asp Leu Glu						
15	20	25				
ctt gtt gca gag atc ggc gtc gac gat gat ttg agc ctt ctg gta gac	985					
Leu Val Ala Glu Ile Gly Val Asp Asp Asp Leu Ser Leu Leu Val Asp						
30	35	40	45			
aac ggc gct gaa gtt gtc gtt gac ttc acc act cct aac gct gtg atg	1033					
Asn Gly Ala Glu Val Val Val Asp Phe Thr Thr Pro Asn Ala Val Met						
50	55	60				
ggc aac ctg gag ttc tgc atc aac aac ggc att tct gcg gtt gtt gga	1081					
Gly Asn Leu Glu Phe Cys Ile Asn Asn Gly Ile Ser Ala Val Val Gly						
65	70	75				
acc acg ggc ttc gat gat gct cgt ttg gag cag gtt cgc gac tgg ctt	1129					
Thr Thr Gly Phe Asp Asp Ala Arg Leu Glu Gln Val Arg Asp Trp Leu						
80	85	90				
gaa gga aaa gac aat gtc ggt gtt ctg atc gca cct aac ttt gct atc	1177					
Glu Gly Lys Asp Asn Val Gly Val Leu Ile Ala Pro Asn Phe Ala Ile						
95	100	105				
tct gcg gtg ttg acc atg gtc ttt tcc aag cag gct gcc cgc ttc ttc	1225					
Ser Ala Val Leu Thr Met Val Phe Ser Lys Gln Ala Ala Arg Phe Phe						
110	115	120	125			
gaa tca gct gaa gtt att gag ctg cac cac ccc aac aag ctg gat gca	1273					
Glu Ser Ala Glu Val Ile Glu Leu His His Pro Asn Lys Leu Asp Ala						
130	135	140				

cct tca ggc acc gcg atc cac act gct cag ggc att gct gcg gca cgc 1321
 Pro Ser Gly Thr Ala Ile His Thr Ala Gln Gly Ile Ala Ala Arg
 145 150 155

aaa gaa gca ggc atg gac gca cag cca gat gcg acc gag cag gca ctt 1369
 Lys Glu Ala Gly Met Asp Ala Gln Pro Asp Ala Thr Glu Gln Ala Leu
 160 165 170

gag ggt tcc cgt ggc gca agc gta gat gga atc ccg gtt cat gca gtc 1417
 Glu Gly Ser Arg Gly Ala Ser Val Asp Gly Ile Pro Val His Ala Val
 175 180 185

cgc atg tcc ggc atg gtt gct cac gag caa gtt atc ttt ggc acc cag 1465
 Arg Met Ser Gly Met Val Ala His Glu Gln Val Ile Phe Gly Thr Gln
 190 195 200 205

ggt cag acc ttg acc atc aag cag gac tcc tat gat cgc aac tca ttt 1513
 Gly Gln Thr Leu Thr Ile Lys Gln Asp Ser Tyr Asp Arg Asn Ser Phe
 210 215 220

gca cca ggt gtc ttg gtg ggt gtg cgc aac att gca cag cac cca ggc 1561
 Ala Pro Gly Val Leu Val Gly Val Arg Asn Ile Ala Gln His Pro Gly
 225 230 235

cta gtc gta gga ctt gag cat tac cta ggc ctg taaaggctca tttcagcagc 1614
 Leu Val Val Gly Leu Glu His Tyr Leu Gly Leu
 240 245

gggtggaatt ttttaaaagg agcgtttaaa ggctgtggcc gaacaagtta aattgagcgt 1674

ggagttgata gcgtgcagtt cttttactcc acccgctgat gttgagtggc caactgatgt 1734

tgagggcgcg gaagcactcg tcgagtttgc gggtcgtgcc tgctacgaaa cttttgataa 1794

gccgaaccct cgaactgctt c 1815

<210> 3

<211> 248

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 3

Met Gly Ile Lys Val Gly Val Leu Gly Ala Lys Gly Arg Val Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ile Val Ala Ala Val Asn Glu Ser Asp Asp Leu Glu Leu Val Ala
 20 25 30

Glu Ile Gly Val Asp Asp Asp Leu Ser Leu Leu Val Asp Asn Gly Ala
 35 40 45

Glu Val Val Val Asp Phe Thr Thr Pro Asn Ala Val Met Gly Asn Leu
 50 55 60

Glu Phe Cys Ile Asn Asn Gly Ile Ser Ala Val Val Gly Thr Thr Gly
 65 70 75 80

Phe Asp Asp Ala Arg Leu Glu Gln Val Arg Asp Trp Leu Glu Gly Lys
 85 90 95

Asp Asn Val Gly Val Leu Ile Ala Pro Asn Phe Ala Ile Ser Ala Val
 100 105 110

Leu Thr Met Val Phe Ser Lys Gln Ala Ala Arg Phe Phe Glu Ser Ala

115	120	125
Glu Val Ile Glu Leu His His Pro Asn Lys Leu Asp Ala Pro Ser Gly		
130	135	140
Thr Ala Ile His Thr Ala Gln Gly Ile Ala Ala Ala Arg Lys Glu Ala		
145	150	155
Gly Met Asp Ala Gln Pro Asp Ala Thr Glu Gln Ala Leu Glu Gly Ser		
165	170	175
Arg Gly Ala Ser Val Asp Gly Ile Pro Val His Ala Val Arg Met Ser		
180	185	190
Gly Met Val Ala His Glu Gln Val Ile Phe Gly Thr Gln Gly Gln Thr		
195	200	205
Leu Thr Ile Lys Gln Asp Ser Tyr Asp Arg Asn Ser Phe Ala Pro Gly		
210	215	220
Val Leu Val Gly Val Arg Asn Ile Ala Gln His Pro Gly Leu Val Val		
225	230	235
Gly Leu Glu His Tyr Leu Gly Leu		
245		

<210> 4
 <211> 79
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <223> dapA Wildtyp-promóter

<400> 4
 gttaggtttt ttgcgggggtt gtttaacccc caaatgaggg aagaaggttaa ccttgaactc 60
 tatgagcaca ggtttaaca 79

<210> 5
 <211> 79
 <212> DNA
 <213> mesterséges szekvencia

<220>
 <223> A mesterséges szekvencia leírása:
 dapA-promóter C. glutamicum-ból
 MC20-mutációval

<220>
 <221> mutáció
 <222> (45)

<400> 5
 gttaggtttt ttgcgggggtt gtttaacccc caaatgaggg aagatggttaa ccttgaactc 60
 tatgagcaca ggtttaaca 79

<210> 6
 <211> 80
 <212> DNA
 <213> mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása:
dapA-promóter C. glutamicum-ból
MC16-mutációval

<220>

<221> mutáció.

<222> (35)..(53)

<400> 6

gttaggtttt ttgcgggggtt gtttaacccc caaaatgagg gaagaaggta taattgaact 60
ctatgagcac aggtttaaca 80

A következő ábrákat mellékeljük:

1. ábra: A pEC7lyse plazmid
2. ábra: A pEC7dapB plazmid
3. ábra: A pEC7dapBlyse plazmid

Az ábrákon alkalmazott rövidítések jelentése a következő:

Cm kloramfenikol rezisztencia gén

dapB a *C. glutamicum* adpB génje

lyse a *C. glutamicum* lyse génje

pyc a *C. glutamicum* pyc génje

OriE plazmid kódolt replikációs eredetű *E. coli*

pBL a pBL1 plazmid DNS fragmentuma

EcoRI az EcoRI restrikciós enzim hasítási helye

EcoRV az EcoRV restrikciós enzim hasítási helye

HincII a HincII restrikciós enzim hasítási helye

HindIII a HindIII restrikciós enzim hasítási helye

KpnI a KpnI restrikciós enzim hasítási helye

SalI a SalI restrikciós enzim hasítási helye

SmaI a SmaI restrikciós enzim hasítási helye

SphI a SphI restrikciós enzim hasítási helye

PvuII a PvuII restrikciós enzim hasítási helye

BamHI a BamHI restrikciós enzim hasítási helye

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Fokozott aktivitású lysE génnel rendelkező, L-lizint termelő korineform baktériumok, amelyekben további gének, mégpedig a dapA gén /dihidropikolinát-szintetáz gén/, lysC gén /aszpartát-kináz gén/, dapB gén /dihidropikolinát-reduktáz gén/ vagy a pyc gén, külön-külön vagy együtt fokozott aktivitású, különösen túlexprimált.

2. Az 1. igénypont szerinti korineform baktériumok, amelyekben a dapB gén fokozott aktivitású, különösen túlexprimált.

3. Az 1. igénypont szerinti korineform baktériumok, amelyekben a dapB gén - amely még e génnek a SEQ-ID-No. 1-ben bemutatott transzlációs startja előtti 5' tartományát is tartalmazza - fokozott aktivitású, különösen túlexprimált.

4. Az 1. igénypont szerinti korineform baktériumok, amelyek a dapA promóternek a SEQ-ID-No. 5-ben és a SEQ-ID-No. 6-ban bemutatott MC20 vagy MA16 mutációját hordozzák.

5. Korineform baktériumokban replikálható, Corynebacteriumból származó, előnyösen rekombináns DNS, amely legalább azt a nukleotid szekvenciát tartalmazza, amely még a dapB gén transzlációs tartománya előtti 5' tartományt - a SEQ-ID-No. 1 szerint - is kódolja.

6. Az 5. igénypont szerinti replikálható DNS, amelynek nukleotid szekvenciája a SEQ-ID-No. 1 szerinti.

7. Az 1. igénypont szerinti korineform baktériumok, amelyekben a dapA gén és a lysC gén fokozott aktivitású, közelebbről túlexprimált.

8. Eljárás L-lizin előállítására fokozott lysE gént tartalmazó korineform baktériumokkal végzett fermentációval, azzal jellemezve, hogy olyan baktériumokat alkalmazunk, amelyekben a géneket kódoló nukleotid szekvenciákat - amilyen a dapA, lysC, pyc vagy a dapB gén - külön-külön vagy együtt fokozzuk, különösen túlexprimáljuk.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan baktériumokat alkalmazunk, amelyekben a dapA és a lysC gén egyidejűleg fokozott, különösen túlexprimált.

10. A 8. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan baktériumokat alkalmazunk, amelyekben a dapA és a dapB gén egyidejűleg fokozott, különösen túlexprimált.

11. A 9. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy egy vagy több plazmidvektorral transzformált törzset alkalmazunk, amely plazmidvektor(ok) a fokozandó gén nukleotid szekvenciáját hordozza (hordozzák).

12. A 9. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy egy plazmidvektorral transzformált törzset alkalmazunk, amely vektor a dapA, lysC és lysE gént kódoló nukleotid szekvenciát hordoz.

13. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy egy vagy több plazmidvektorral transzformált törzset alkalmazunk, amely plazmidvektor önmagában vagy amely plazmidvektorok együtt a dapA, lysC, pyc és lysE gén nukleotid szekvenciáját hordozza (hordozzák).

14. Egy vagy több előző igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a *Corynebacterium glutamicum* nemzetséghez tartozó baktériumokat alkalmazunk.

15. Egy vagy több előző igénypont szerinti eljárás L-lizin fermentációs úton való előállítására, azzal jellemezve, hogy

i) tenyésztjük az L-lizint termelő baktériumokat, amelyekben az említett gének fokozott aktivitásúak,

ii) a közegben vagy a baktériumokban feldúsítjuk az L-lizint és izoláljuk az L-lizint.

16. A DSM 12871 számon letétbe helyezett *Escherichia coli* K-12 DH5 α /pEC7lyse törzs.

17. A DSM 12875 számon letétbe helyezett *Escherichia coli* K-12 DH5 α /pEC7dapBlyse törzs.

18. A DSM 12869 számon letétbe helyezett DSM5715/pJC23 *Corynebacterium glutamicum* törzs.

19. A DSM 12867 számon letétbe helyezett DSM5715aecD::dapA(MA16) *Corynebacterium glutamicum* törzs.

20. A DSM 12868 számon letétbe helyezett DSM5715aecD::dapA(MC20) *Corynebacterium glutamicum* törzs.

21. A DSM 12866 számon letétbe helyezett DM678 *Corynebacterium glutamicum* törzs.

A meghatalmazott:


Parragh Gáborné dr.

szabadalmi ügyvivő

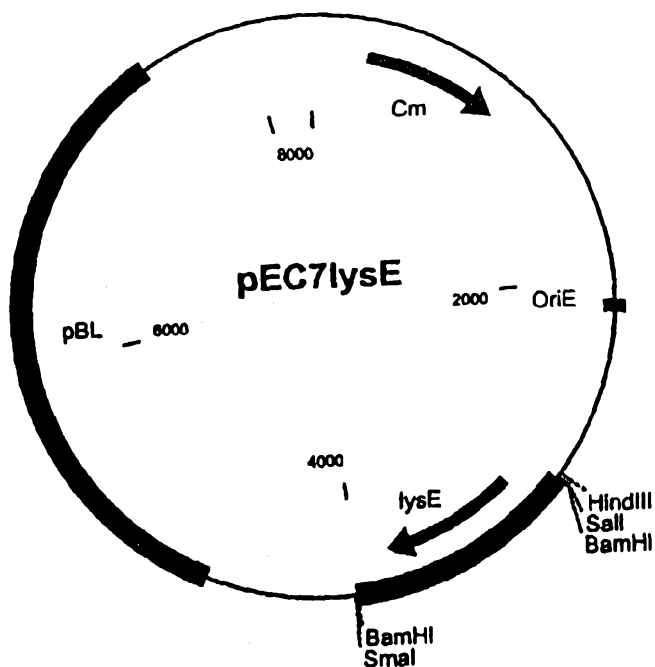
az S.B.G. & K. Nemzetközi

Szabadalmi Iroda tagja

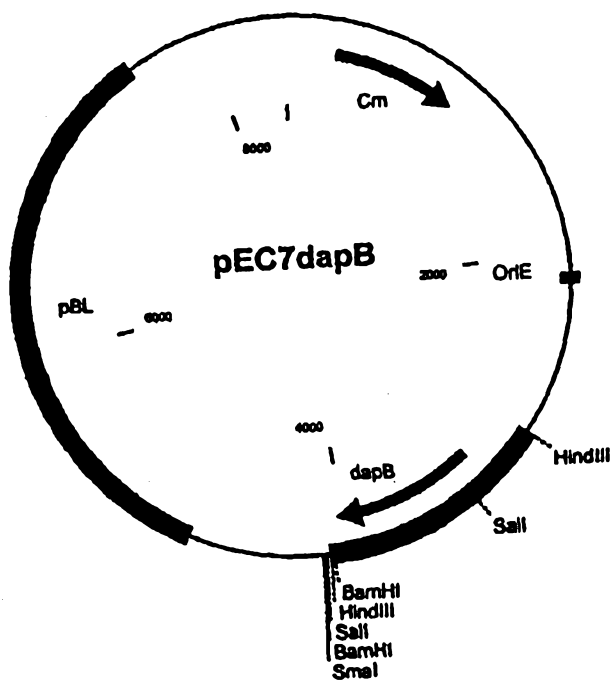
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.

Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

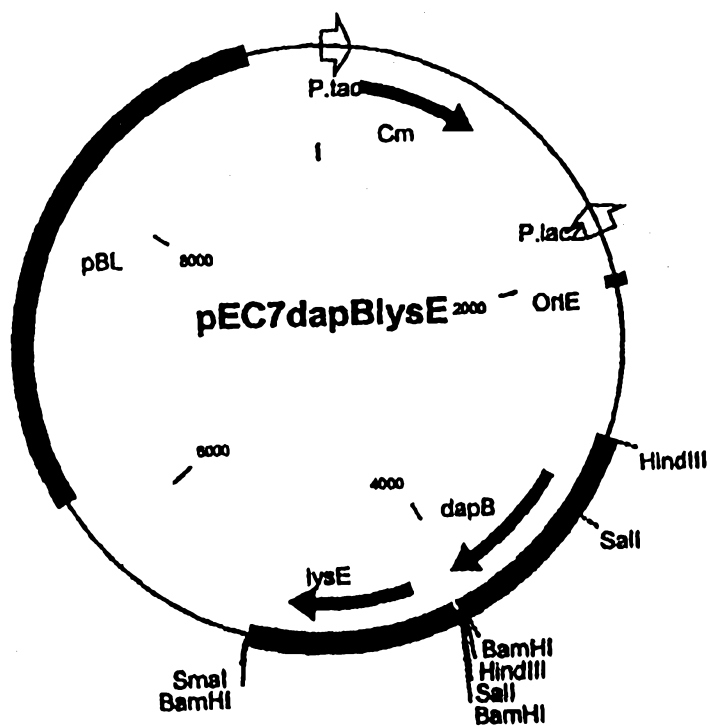
45 oldal
2. és 3. oldal
47 oldal
Parragh



1. ábra: A pEC7lysE plazmid



2. ábra: A pEC7dapB plazmid



3. ábra: A pEC7dapBlysE plazmid