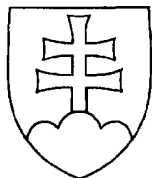


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

282 954

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁷:

C12P 13/22
C12N 1/20
C12N 15/68
C12N 15/71
/(C12N 1/20,
C12R 1:19)

- (21) Číslo prihlášky: **1110-96**
(22) Dátum podania prihlášky: **28. 8. 1996**
(24) Dátum nadobudnutia účinkov patentu: **9. 1. 2003**
Vestník ÚPV SR č.: **1/2003**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **95 18076.6**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **5. 9. 1995**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **GB**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **7. 5. 1997**
Vestník ÚPV SR č.: **05/1997**
(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **6. 12. 2002**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT:
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT:

(73) Majiteľ: **Degussa Aktiengesellschaft, Frankfurt, DE;**

(72) Pôvodca: **Camakaris Helen, Dr., Eaglemont, AU;**
Cowan Peter, Dr., Brighton, AU;
Pittard James, prof., Research, AU;

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

(54) Názov: **Mutantné kmene *E. coli* so zvýšenou schopnosťou produkovať L-tryptofán, spôsob stabilizácie ich charakteristík a spôsob produkcie L-tryptofánu**

(57) Anotácia:

Sú uvedené mutantné kmene *E. coli* so zvýšenou schopnosťou produkovať L-tryptofán zahŕňajúce vo svojom génome mutantný gén, kódujúci čiastočne defektnú tryptofanyl-tRNA-syntetázu, ktorý, keď je prítomný v neproduktívnom kmeni, je charakterizovaný tryptofánovou auxotrofiou závislou od teploty, a s ďalšími mutáciami na chromozóme v jednom alebo vo viacerých génoch selektovaných zo skupiny mtr, aroP, tnaA alebo tnaB, spôsob stabilizácie charakteristík týchto kmeňov a spôsob produkcie L-tryptofánu, ktorý zahŕňa kultiváciu týchto kmeňov *E. coli* pri približne 30 °C, prednostne za prítomnosti kvasinkového extraktu, pričom rast inokula sa limituje pomocou koncentrácie vhodného fosfátu v príslušnom rastovom médiu, fermentáciu pri teplote v rozsahu 33 °C až 37 °C za neprítomnosti kvasinkového extraktu a získanie tryptofánu akumulovaného vo výslednej kultivačnej kvapaline.

SK 282954 B6

Oblasť techniky

Vynález sa týka mutantných kmeňov *E. coli* so zvýšenou schopnosťou produkovať L-tryptofán, spôsobu stabilizácie ich charakteristík a spôsobu produkcie L-tryptofánu.

Vynález poskytuje hostiteľa a spôsob pestovania tohto hostiteľa tak, že plazmidy môžu byť stabilne udržiavané za absencie antibiotík, vedúcej na vysokú produkciu tryptofánu pri fermentácii. Poskytuje významné zlepšenie oproti predchádzajúcim spôsobom a produkuje tryptofán zbavený akejkoľvek kontaminácie tyrozinom a fenylalanínom, a teda zjednodušené postupné spracovanie.

Doterajší stav techniky

V súčasnosti existujú mnohé príklady génovej manipulácie pri mikroorganizmoch na účely získania kmeňov s účinnou nadprodukciou jednotlivých aminokyselín.

V odbore sa všeobecne uznáva, že je nutná interferencia s normálnymi regulačnými okruhmi, ktoré regulujú expresiu génov pre biosyntetické dráhy, selekcia mutantov, ktorých enzýmy už nie sú subjektom spätnoväzbovej inhibície a deaktivácia akýchkoľvek enzýmov, ktoré štiepia žiadaný produkt, ak sa má dosiahnuť akýkoľvek úspech v produkcii jednotlivých aminokyselín. Objavilo sa aj výhodné rozmnožovanie počtu kópií určitých biosyntetických génov v bunke zavedením do bunkových doplnkových génových kópií na plazmidoch. Tieto všeobecné princípy je možné nájsť v Tribe, D. E. and Pittard, (1979), Appl. Environ. Microbiol., 38: 181 - 190, najmä tie, ktoré sa týkajú produkcie tryptofánu.

Význam spätnoväzbovej inhibície prvých enzýmov v aromatickej dráhe /DAHP-syntetázy/ a prvého enzýmu v terminálnej tryptofánovej dráhe a nutnosť zrušenia inhibície je tam tiež demonštrované.

Podobne je už dlho známe, že je nevyhnutné inaktivovať trpR-represorový proteín, ktorý potláča expresiu génov tryptofánového operónu. O tomto sa píše v uvedenej publikácii.

V prípade génov tryptofánu v *E. coli* je ďalší systém regulácie požadovaného útlmu. Dokonca aj trpR-bunkách tryptofán, alebo špecifickejšie, prenášaná tryptofanyl-tRNA reguluje expresiu tryptofánového operónu. Keď je prenášaná tryptofanyl-tRNA v nadbytku, transkripcia mRNA pre trp-operónové gény sa ukončí pred dosiahnutím sekvencií kódujúcich biosyntetické enzýmy v približne v deviatich z desiatich transkriptov /Yanofky, C. /1981/, Nature /London/ 289: 751 - 758. Tomuto predčasnému ukončeniu transkripcie je možné zabrániť pomocou rôznych génových manipulácií, ako je klonovanie trp-génov po heterológom promotore alebo pomocou vynechania miesta zoslabenia. Tribe a Pittard /Appl. Environ. Microbiol. /1979/, 38: 181 - 190/ podali odlišnú stratégiu na prekonanie zoslabenia, v ktorej použili mutant, ktorý obsahoval čiastočne defektný enzým tryptofanyl-tRNA-syntetázu.

Keď sa plazmidy, obsahujúce štrukturálne gény pre trp-operón, zavedú do bunky, v ktorej expresia týchto trp-génov už nie je regulovaná a za absencie akejkoľvek výraznej selekcie plazmidovo kódovaných funkcií, postupná multiplikácia tejto bunky a jej potomstva často končí v plazmidovej strate populácie. V pôvodnom hostiteľovi je tryptofánová prototrofia, bunky, ktoré stratili rast plazmidu rýchlejšie ako bunky, ktoré ho zadržiavajú, ako aj bunky, v ktorých genetické jazy /ako je delécia alebo inzercia/ zoslabili alebo zabránili expresii trp-génov predložených v plazmide. Pri mnohých generáciách sa také bunky

/segreganty a mutanty/ stávajú predovšetkým členmi populácie a ak táto populácia je základom pre fermentáciu, stávajú sa narušeniami fermentácie.

Vyvinuli sa rôzne stratégie na stabilizáciu plazmidovej dedičnosti. Často používanou metódou je zahrnutie génu pre rezistenciu na antibiotiká do plazmidu a pridaním antibiotík do fermentačnej kaše. Táto metóda je ale nákladná a môže zapríčiniť ekologické nebezpečenstvo. Stratégie využívajúce defektných hostiteľov v biosyntéze niektorej zložieniny vyžadovanej na pestovanie spoločne s plazmidom nesúcim gén komplementujúci mutačný defekt sa skôr používali /napríklad v Anderson a kol., U. S. patent 4 371 614/, ale segreganty sa môžu akumulovať, pretože zotrávajú pri syntéze živín pre niekoľko generácií /fenotypické oneskorenie/. Tam, kde je tá istá požiadavka, aj keď živina je akumulovaná, segreganty môžu byť zásobované aj živinou, ktorá sa akumulovala. Obmedzené zlepšenie sa dosiahlo s použitím hostiteľov defektných v prenose, ale toto sa dosiahlo len za podmienok, že tryptofán bol v médiu podradný /Imaka, Patent Disclosure A No. 3-43074/.

Pretrvávajúca požiadavka existencie mikroorganizmov schopných produkovať vysokú roveň tryptofánu. Pripojená je požiadavka metódy stabilizovania plazmidovej dedičnosti v uvedených mikroorganizmoch.

Podstata vynálezu

Predmetom vynálezu sú mutantné kmene *E. coli* so zvýšenou schopnosťou produkovať L-tryptofán zahŕňajúce vo svojom genóme mutantný gén kódujúci čiastočne defektnú tryptofanyl-tRNA-syntetázu, ktorý, keď je prítomný v neproduktívnom kmeni, je charakterizovaný tryptofánovou auxotrofiou závislou od teploty, a s ďalšími mutáciami na chromozóme v jednom alebo vo viacerých génoch selektovaných zo skupiny mtr, aroP, tnaA alebo tnaB.

Predmetom vynálezu je tiež spôsob stabilizácie charakteristík týchto kmeňov, podstata ktorého spočíva v tom, že počas rastu inokula sa do genómu *E. coli* kmeňov zavedie mutantný gén kódujúci čiastočne defektnú tryptofanyl-tRNA syntetázu, ktorý, ak je prítomný v neproduktívnom kmeni, je charakterizovaný tryptofánovou auxotrofiou závislou od teploty, a ďalej sa na chromozóm zavedú ďalšie mutácie v génoch aroP, mtr, tnaA alebo tnaB a uvedení kmeň sa kultivuje pri teplote v rozmedzí 27 °C až 30 °C.

Predmetom vynálezu je konečne tiež spôsob produkcie L-tryptofánu fermentáciou, ktorého podstata spočíva v tom, že zahŕňa kultiváciu uvedených kmeňov *E. coli* pri približne 30 °C prednostne za prítomnosti kvasinkového extraktu, pričom rast inokula sa limituje pomocou koncentrácie vhodného fosfátu v príslušnom rastovom médiu a fermentáciu pri teplote v rozsahu 33 °C až 37 °C za neprítomnosti kvasinkového extraktu a získanie tryptofánu akumulovaného vo výslednej kultivačnej kvapaline.

Tieto a ďalšie predmety vynálezu, ktorý bude ďalej podrobnejšie vysvetlený, sa dosiahli za predpokladu: kmene *E. coli* K-12 s produktivitou tryptofánu a obsahujúce vo svojom genóme mutantný gén kódujúci čiastočne defektnú tryptofanyl-tRNA-syntetázu, udržiavajúci teplotne podmienenú tryptofánovú auxotrofiu do hostiteľa a ďalšie mutácie v chromozóme, ktoré blokujú transportné systémy zakódované pomocou aroP, mtr a tnaB, také kmene obsahujúce trpE-alelu kódujúcu antranilátsyntetázu rezistentnú proti spätnoväzbovej inhibícii pri vysokých koncentráciách tryptofánu.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Vynález je ilustrovaný pomocou opisu nasledujúcich obrázkov:

Obr. 1: Rýchlosť rastu JP7847 (*trpS*⁻) a JP6006 (*trpS378*) pri 30 °C ako funkcia koncentrácie tryptofánu v médiu. Médium je napoly zriedený tlmivý roztok 56 (Monod, J., G. Cohen-Bazire a M. Cohen (1951). *Biochimica et Biophysica Acta* 1: 585 - 599) doplnený tiámínom na 10 µg/ml a glukózou na 0,2 %. Obidva kmene sú tryptofánové auxotrofy kvôli delécii Δ *trpLE1413* a obidva sú defektné v aktívnom odvádzaní tryptofánu kvôli mutácii *mtr-24*, *tna-1* a *aroP519*. Obidva sú v prísade *sac*⁺*aroF363* *aroG103*/FBR/*trpR363* *tyrR366*.

Obr.2: Stabilita a produktivita tryptofánového produktívneho kmeňa /JP6015/pMU91/, pestovaného v bankách s rozličnou teplotou.

Obr. 3: Stabilita a produktivita tryptofánového produktívneho kmeňa /JP6015/pMU91/ pestovaného v bankách pri 30 °C za prítomnosti kvasinkového extraktu s rozličnou koncentráciou.

Obr. 4: Porovnanie citlivosti na spätnoväzbovú inhibíciu in vitro antranilátsyntetázových enzýmov z kmeňa s divým typom *trpE*-alel /JP6768/pMU3018/ a kmeňov s mutáciou *trpE* 476 /JP 6768/ pMU3019/ s *trpE483* /JP6768/pMU3025/.

Obr. 5: Rastúce krivky pri 42 °C *aroB*⁺ *trpS*⁺ kmeňa /JP8820/ v minimálnom médiu a *aroB*⁺ *trpS378* kmeňa /JP1451/ v minimálnom médiu doplnenom rozličnými množstvami tryptofánu.

Obr. 6: Reštrikčné mapy pMU3018 /obr. 6a/, pMU3019 /obr. 6b/ a pMU3025 /obr. 6c/. Vo všetkých prípadoch je vektor /pMU578/ znázornený ako čierny. pMU3019 bol konštruovaný podobne ako pMU3018 s použitím fragmentu *Sma*I/*Hind*III s 2,9 kb, obsahujúceho 5'-koniec *trp*-operónu, ale s *trpE476* skôr ako s *trpE* divého typu. PMU3025 bol odvodený z pMU3018 mutagenézou, ako je opísané v príklade 2.

Obr. 7: Inkorporácia *trpE483* do *trp*-operónu.

Obr. 8: Reštrikčná mapa pMU3028. Vektor /pLG339/ je znázornený ako čierny. Konštruovaný dvojstupňovým klonovaním:

/i/ fragment s 2,6 kb nesúci *serA*⁺ bol klonovaný do *Sma*I polohy pLG339;

/ii/ *Sal*I fragment s 8,1 kb nesúci *trpE483DCBA* z pMU3027 /pozri obr. 7/ bol klonovaný do *Xho*I polohy výsledného plazmidu.

Obr. 9: Reštrikčná mapa pMU91.

Nasleduje podrobný opis vynálezu.

Predložený vynález poskytuje spôsob získania veľkých množstiev L-tryptofánu fermentáciou za použitia kmeňov *E. coli* K-12.

Tieto kmene s produktivitou L-tryptofánu obsahujú vo svojom génome mutantný gén kódujúci čiastočne defektnú tryptofanyl-tRNA-syntetázu zavádzajúcu teplotne podmienenú tryptofánovú auxotrofiu do hostiteľa a ďalšie mutácie na chromozóme, ktoré blokujú transportné systémy zakódované pomocou *aroP*, *mtr* a *tnaB* a sú transformované plazmidom obsahujúcim tryptofánový operón kódujúci antranilátsyntetázu, zbavenú spätnoväzbovej inhibície pri tryptofáne.

Ako je opísané v 2. odseku /stave techniky/, existuje problém s kmeňmi produkujúcimi vo zvýšenej miere zvláštnu živinu, kde udržiavanie stability je závislé len od hostiteľa, ktorý má požiadavku na nadprodukovanú živinu, pretože segregáty budú pokračovať v raste, po prvé kvôli fenotypickému oneskoreniu a po druhé, pretože budú

ľahko zásobované živinou, ktorá sa akumulovala. Dokonca ak aj hostiteľský kmeň je defektný v aktívnom prenose živiny, selekcia sa podarí len vtedy, keď je koncentrácia živiny relatívne nízka. Ako znázorňuje obr. 1, pri obsahu tryptofánu, ako je 1 mM alebo väčší, tryptofánová auxotrofná forma neschopná aktívneho prenosu tryptofánu predsa však narastá s normálne zdvojnásobujúcim sa časom. Táto koncentrácia tryptofánu 1 mM alebo približne 0,2 g/l sa rýchlo dosiahne, keď sa pestuje kmeň produkujúci tryptofán, a preto selekcia plazmidovej stability sa prudko stráca za podmienok produkcie.

Zistili sme, že *trp*⁻-kmene s mutáciou, zvlášť ako je *trpS378*, ktorá čiastočne inaktivuje tryptofanyl-tRNA-syntetázové enzýmy, vyžadujú veľmi vysoké koncentrácie tryptofánu v bunke. Obrázok 1 ukazuje, že ak prenosovo negatívny mutant nesie aj *trpS378* mutáciu, vyžaduje sa aspoň 5 mM tryptofánu pre náležitý rast na uskutočnenie dokonca aj pri 30 °C. Toto znamená, že pokiaľ koncentrácia tryptofánu v médiu nedosiahne 1 g/l akéhokoľvek segregátu produkovaného pomocou plazmidového úbytku, bude rast uskutočňovaný nevýhodne. Táto požiadavka veľmi vysokých koncentrácií tryptofánu, skôr ako segregáty úplne konkurujú v raste, je významným zlepšením, pretože sa selekcie udržiava na retenciu plazmidu nielen počas pestovanie inokula, ale aj pri úplne najväčšej miere produkcie počas záverečnej fermentácie. Táto kombinácia prenosovo-negatívnych mutácií a zvlášť *trpS378* významne zvyšuje výťažky tryptofánu, v porovnaní s *trpS*⁺ prenosovo-negatívnymi kombináciami. Uvedené mutácie prednostne deaktivujú transportné systémy zakódované pomocou *aroP*, *mtr* a *tnaB*. Typické kmene zahrnujú, ale nie sú obmedzené na kmene obsahujúce mutantné alely charakterizované pomocou *aroP579*, *mtr-24* a *tnaA1*.

V oddelených pokusoch s použitím nadproduktívneho kmeňa nesúceho *trpS378*-alelu a plazmidu nesúceho *trpE476DCBA* kódujúceho spätnoväzbovo rezistentnú antranilátsyntetázu, sme demonštrovali, že teplotne citlivá alela *trpS378* sa môže použiť efektívne pri zvolených teplotách na podporenie buď stability, alebo produktivity. Zistili sme, že také produkčné kmene nesúce *trpS378* sú stabilnejšie pri približne 30 °C ako pri približne 37 °C. Pri približne 37 °C produktivita vzrastá a stabilita klesá. Výsledky sú na obrázku 2 pre produkčný kmeň JP6015/pMU91. Úroveň stability, v tomto prípade poskytovaná pomocou *serA*⁺-komplementácie, môže byť významne zvýšená pomocou voľby inkubačnej teploty. Podobné výsledky sa dosiahli pre ostatné kmene.

Zistili sme aj to, že prísada kvasinkového extraktu ďalej znižuje produktivitu pri 30 °C tak, že obsah tryptofánu nepresahuje 0,2 až 0,3 g/l. Toto má za následok významné zvýšenie stability, ako ukazuje obr. 3. Niektoré kmene zostávajú stabilné pre viac ako 60 generácií.

Spätnoväzbová inhibícia antranilátsyntetázy

Aktivita antranilátsyntetázy v kmeňoch *Escherichia coli* divého typu je extrémne citlivá na spätnoväzbovú inhibíciu pri tryptofáne, prejavujúc približne 50 % inhibíciu pri koncentráciách tryptofánu takých nízkych ako 0,02 mM. Spätnoväzbovo rezistentné mutanty boli zverejnené v rôznych publikáciách, napríklad v Aiba et al., Canadian Patent Application No. 1182409, Tribe a Pittard, /1979/, Applied and Environmental Microbiol. 38: 181 - 190, Aiba et al., /1982/, Applied and Environmental Microbiol. 43: 289 - 297. Vo všetkých prípadoch izolácia takých mutantov zahŕňovala selekciu na rezistenciu na inhibíciu rastu tryptofánovými analógmi. Typicky, mutanty zvolené na účely nadprodukcie tryptofánu podržali niektorú spätnoväzbovú in-

hibíciu, ale 50 % počtu sa vyskytovalo pri koncentrácii približne 13 mM skôr ako 0,02 mM /pozri Aiba et al., Canadian Patent Application No. 1182409/. Kde boli opísané mutanty udeľujúce vyššiu spätnoväzbovú rezistenciu /50 % hodnôt inhibície vyšších ako 20 mM/, mali za následok zníženie akumuláciu tryptofánu, možno kvôli narušenej aktivite spätnoväzbovo rezistentných enzýmov [Aiba et al., /1982/, Applied and Environmental Microbiol. 43: 289 až 297].

Dva spätnoväzbovo rezistentné mutanty, ktoré sme izolovali, boli typické pre tie pôvodne používané v nadprodukcii tryptofánu, obsahujúce alely *trpE476* a *trpE382* kódujúce enzýmy prejavujúce menej ako 10 % inhibície aktivity pri 1 mM tryptofáne /pozri príklad 2/.

Keď sa použil produkčný kmeň s takou mutáciou vo fermentéri, pozorovali sme, že na konci fermentácie každý gram tryptofánu, ktorý sa tam akumuloval, bolo približne aj 20 - 60 mg tyrozínu aj fenylalanínu. Aj keď tieto aminokyseliny tvoria malú frakciu aromatického produktu, sú vedľajšími produktmi, ktoré tvoria závažnejšie ťažkosti v následnom znovuzískaní tryptofánu.

Keď sme hľadali bázu pre túto akumuláciu, zistili sme, že pri koncentráciách tryptofánu 12 g/l /60 mM/ tieto dve spätnoväzbovo rezistentné antranilátsyntetázy boli inhibované na 60 - 80 %. Inými slovami, enzýmy, ktoré sa javili ako rezistentné pri koncentráciách 1 mM, boli neschopné pôsobiť účinne za aktuálnych podmienok priemyselnej fermentácie. Nikto z odboru sa nezmieňuje o nadproduktívnych kmeňoch s enzýmami rezistentnými na spätnoväzbovú inhibíciu pri veľmi vysokých obsahoch vhodne prítomných vo fermentačnej nádrži, pri udržiavaní normálnej aktivity, a tým zlepšenej produktivite.

Aby sa prekonal tento problém inhibície antranilátsyntetázy pri vysokých koncentráciách tryptofánu, izolovali sme nový spätnoväzbovo rezistentný mutant /*trpE483*/, ktorý tvorí antranilátsyntetázový enzým, ktorý prejavuje menej ako 10 % inhibície aktivity pri koncentráciách tryptofánu vysokých až 13,5 g/l /pozri obr. 4/. Keď boli konštruované produkčné kmene s *trpE483*-alelou a použité vo fermentácii za podmienok, ktoré pôvodne produkovali približne 20 - 60 mg tyrozínu aj fenylalanínu na gram tryptofánu, nebol detegovaný žiadny tyrozín ani fenylalanín a výťažok tryptofánu zostával vysoký. Toto je v zreteľnom kontraste so skoršími výsledkami zverejnenými Aiba et al., /Applied and Environmental Microbiol. /1982/ 43: 289 - 297/ s antranilátsyntetázovými mutantmi prejavujúcimi rezistenciu na veľmi vysoké obsahy tryptofánu, kde tryptofánová produktivita klesala.

Izolácia *trpE483*-alely sa dosiahla, ako opisuje príklad 2, s použitím plazmidu nesúceho *trp*-operón. Taký plazmid nesúci *trp*-operón môže byť ľahko skonštruovaný za použitia známych techník, ako reštrikčné enzýmové natrávenie, ligácia a transformácia /Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, /1982/. *trp*-operón môže byť odvodený z chromozomálnej DNA *E. coli* alebo zo špecifikovaného transduktívneho fága ϕ 80pt190h /Hershfield, V. et al., /1974/, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71: 3455-3459/, a môže byť inzerovaný do niektorého z množstva vhodných vektorov zahrnujúceho, ale nie obmedzujúceho sa na tie derivované z pSC101 /Cohen, S. N. and A. C. Chang /1977/, J. Bacteriol. 132, 734 - 737/, R388 /Datta, N. and R. W. Hedges /1971/ J. Gen. Microbiol. 72: 349/ atď. Vektor môže niesť navyše *serA*⁺-gén klonovaný podobnými technikami. Plazmid takto konštruovaný je potom prenesený do hostiteľa *E. coli* K-12 transformáciou.

Vynález sa ďalej týka metódy pestovania a fermentácie uvedených kmeňov *E. coli* K-12 prejavujúcich vysokú produktivitu. Keď sa pestovali mikroorganizmy v dávkovej kultúre na produkciu aminokyselín, skutočná produkcia aminokyselín je potrebná len počas malého počtu generácií, ktoré sa vyskytujú v poslednej fermentačnej nádobe. Na 100 000 litrový fermentor môže byť potrebných len 5 až 10 generácií, zatiaľ čo na podanie inokula na takú nádobu je potrebných 50 alebo viac generácií.

Použitie postupov opísaných, využívajúcich špecifické genetické mutácie v kombinácii so špecifickými podmienkami pestovania zaisťuje potrebnú stabilitu kmeňa, pri umožnení maximálnej produktivity tryptofánu počas pestovania v poslednej fermentačnej nádobe. Vysoké výťažky tryptofánu sa môžu dosiahnuť dokonca aj bez použitia antibiotík v záverečnej fermentácii /príklad 6/. Použitie JP4735/pMU3028 má za následok vysokú produktivitu tryptofánu s nevýznamnou tvorbou tyrozínu s fenylalanínu.

Následujúce kmene *E. coli* K-12 boli deponované v zbierke kultúr Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen /DSM/ v Braunschweigu /Nemecko/ podľa budapeštianskej dohody:

JP7847 pod prírastkovým číslom DSM10119,

JP6006 pod prírastkovým číslom DSM10118,

JP6768/pMU3018 pod prírastkovým číslom DSM10120,

JP6768/pMU3025 pod prírastkovým číslom DSM10121,

JP4735/pMU3028 pod prírastkovým číslom DSM10122,

JP6015/pMU91 pod prírastkovým číslom DSM10123.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Izolácia teplotne senzitivných tryptofánových auxotrofných foriem s mutáciami v *trpS*-géne

Kmeň *Escherichia coli* K-12, KA56 /galE⁻, thi⁻/ /Russell R. R. B. a A. J. Pittard /1977/, J. Bacteriol. 108: 790 - 798/ sa spracoval s mutagénom N-metyl-N'-nitro-N-nitrozoguanidínom spôsobom podľa Adalberga, Mandela a Chena /Biochem Biophys Res Commun. /1965/, 18: 788 - 795/. Po spracovaní s mutagénom boli bunky premyté a resuspendované v minimálnom médiu doplnenom casaminokyselinami a glycerolom ako zdrojom uhlíka, za použitia obohateného postupu vyvinutého v tomto laboratóriu /Russell, R. R. B. and A. J. Pittard /1971/, J. Bacteriol. 108: 790 - 798/. Po niekoľkých hodinách rastu pri 32 °C bola kultúra presadená k 42 °C a jednu hodinu neskôr sa pridala galaktóza do výslednej koncentrácie 2 %. Bunky, ktoré boli bez uridíndifosfátgalaktózy-4-epimerázy /t. j. galE⁻/, ale boli schopné syntetizovať enzýmy galaktokinázu a galaktóza-1-fosfáturidylyltransferázu v odpovedi na pridanie galaktózy, akumulovali UDP-galaktózu, ktoré je toxická pre bunku a zapríčiňuje lýzu bunky /Fukasawa, T., and H. Nikaído, /1959/, Nature /London/, 184: 1168 - 1169/. Bunky, ktoré nie sú schopné syntetizovať nové enzýmy v glycerol-galaktózocasaminokyselinovom médiu pri 42 °C nevytvárajú túto zlúčeninu a nie sú usmrtené. Medzi takými, čo prežili, niektorá môže poskytovať teplotne senzitivné auxotrofné formy s mutáciami v *trpS*-géne. /Casaminokyseliny obsahujú veľmi málo tryptofánu/. Po 5 hodinách pri 42 °C za prítomnosti galaktózy sú bunky znovu získané, premyté a buď /1/ pridané do živnej pôdy pri 32 °C a fermentované do strednej exponenciálnej fázy, alebo /2/ rozostreté na živné agarové platne, aby sa získalo približne 200 kolónii na platňu, inkubované 48 hodín pri 32 °C. Kolónie na každej živnej agarovej platni boli replikované do dvoch platní a MM a MM doplneného L-tryptofanom s 10⁻³

M/MM + Trp/. /MM predstavuje napoly zriedené Medium 56 / Monod, Cohen-Bazire and Cohen /1951/, Biochim. Biophys. Acta 1, 585/ stužené s použitím 1 % Oxoid č. 1 Agar, a obsahujúce glukózu a tiamín. Jedna súprava platní /MM a MM + Trp/ bola inkubovaná pri 32 °C a druhá pri 42 °C. Kolónie, ktoré mohli rásť na MM pri 32 °C, ale nie pri 42 °C, ale rásť na MM + Trp médiu pri 42 °C, sú potenciálnymi teplotne senzitivnými tryptofánovými auxotrofnými formami. Na identifikáciu medzi tými mutantmi so zmenami v trpS-géne, je potrebné pripraviť P1-transdukčívny fág na mnohých klonoch a transdukovať aroB⁺ do aroB⁻ mutantu, ako je AB2826 /Pittard, J. and B. J. Wallace, /1996/, J. Bacteriol. 91 : 1494 - 1508/ selektujúci Aro⁺ transduktanty na MM pri 32 °C. Tieto transduktanty boli potom testované na ich schopnosť rásť na MM a MM + Trp pri 42 °C. Kde je pôvodná tryptofánová auxotrofná forma mutovaná v trpS-géne, približne 50 % Aro⁺ transduktantov vyžaduje tryptofán pre rast pri 42 °C. V alternatívnom postupe je pestovaná kultúra na živnej pôde pripravená po usmrtení galaktózou použitá na prípravu P1-lyzátu. Tento lyzát je zasa použitý s AB2826 na selekciu aroB⁺ transduktantov na MM pri 32 °C. Také transduktanty sa potom triedia na klony, ktoré môžu rásť len na MM pri 42 °C, ak je pridaný tryptofán do média. Obrázok 5 znázorňuje krivky rastu dvoch transduktantov, jedným je aroB⁺ trpS378 /JP1451/ s druhým aroB⁺ trpS⁻ /JP8820/, v glukózovom médiu doplnenom rôznymi množstvami tryptofánu pri 42 °C. Je možné vidieť, že teplotne senzitivný fenotyp môže byť zachovaný pri vysokých hladinách tryptofánu pri neprípustnej teplote.

Príklad 2

Selekcia mutantu antranilátsyntetázy rezistentného na spätnoväzbovú inhibíciu pri veľmi vysokých hladinách tryptofánu

Plazmid pMU3018 /obr. 6/ nesie trp-promótor, trpE-gén a časť trpD-génu na SmaI HindIII fragmente s 2,9 kb. pMU3018 je odvodený z pMU578, ktorý je jednoduchou kópiou Trp^R plazmidu nesúceho galK'-lac'ZA fúziu, podobne ako promótor klonujúci vektor pMU575 /Andrews, A. E., B. Lawley, and A. J. Pittard, /1991/, J. Bacteriol. 173: 5068 - 5078/, ale s SmaI EcoRI BglII linkerom nahrádzajúcim SmaI polohu, a s DraI fragmentmi odstránenými deléciou lacY a lacA. Ak je pMU3018 natrávená týmito dvoma enzýmami a fragmenty podrobené elektroforéze v agarózovom géle s nízkou teplotou topenia, je to jednoduchý materiál na separáciu a purifikáciu trpE-trpD'-fragmentus 2,9 kb a dlhšieho vektorového fragmentu s 13 kb. Tento 2,9 kb fragment bol podrobený mutagéníze s 50 mM kyselinou disoitou počas 60 minút podľa metódy Raya a kol. /Ray, J. M., C. Yanofsky and R. Bauerle, /1988/, J. Bacteriol. 170: 5500 - 5506/, okrem toho spermin /1 mM/ bol pridaný k mutagénzovej zmesi. Po mutagéníze bol fragment znovu podrobený ligácii s dlhším 13 kb fragmentom a produkty ligácie boli transformované do kmeňa JP6768, kmeňa *E. coli*, ktorý je trpR⁻ a v ktorom trpE-gén bol deletovaný z chromozómu, ale trpDCB a A sú úplne funkčné /AtrpLE1413 /Miozzari, G. F. and C. Yanofsky, /1978/ J. Bacteriol. 133: 1457 - 1466/. Približne 2000 transformantov bolo selektovaných na Luria agar obsahujúcom trimetoprim. Tieto boli triedené podľa rastu na minimálnom médiu doplnenom tryptofánovým analógom 5-fluórtryptofán na 15 mM. Klony, ktoré rástli boli potenciálnymi spätnoväzbovo rezistentnými mutantmi mutovanými v enzýme antranilátsyntetáze. Aktivita antranilátsyntetázy v každom z týchto klonov bola analyzovaná v prítomnosti veľmi vysokých hladín tryptofánu /13,5 g/l/ s po-

užitím analýzy opisanej v Cho, K-0, end Yanofsky, /1988/, J. Mol. Biol. 204: 41 - 50. Klon, ktorého antranilátsyntetázová aktivita prejavovala menej ako 10 % inhibície pri týchto veľmi vysokých obsahoch tryptofánu, bol identifikovaný medzi rezistentnými mutantmi. Mutantná alela prítomná v tomto kmeni bola nazvaná trpE483. V porovnaní alela trpE476 kóduje antranilátsyntetázu s dobrou rezistenciou pri 1 g/l tryptofánu, ale viac ako 60 % inhibíciou pri 13,5 g/l tryptofánu. Obrázok 4 porovnáva spätnoväzbovú senzitivitu antranilátsyntetázy z kmeňa s alelou divého typu /JP6768/pMU3018/ a kmeňov s trpE483-alelou /JP6768/pMU3025/ a s trpE476-alelou /JP6768/pMU3019/.

Aby sa rekonštituoval trp-operón s trpE483-alelou, fragment s 2,9 kb nesúci ho bol pripojený k HindIII SmaI fragmentu s 21 kb z pMU575-derivátu, pMU1881, ktorý niesol trpDCBA-gény. Toto rezultuje v plazmide pMU3027. Toto je zhrnuté na obrázku 7. Tento nový trp-operón inkorporujúci trpE483 bol postupne transferovaný do pSC101-derivátu pLG339 /Stocker, N. G. et al., /1982/, Gene 18, 335 - 341/ nesúceho serA⁺, na tvorenie pMU3082, ktorý je znázornený na obrázku 8.

Za podmienok, pri ktorých kmene s trpE476-alelou akumulovali tyrozín a fenylalanín, kmeň s trpE483-alelou neprodukoval žiadny detegovateľný tyrozín /pozri príklad 6/. Odborníkom v odbore je zrejmé, že pôda bez vedľajších produktov, ako je tyrozín a fenylalanín, je výhodnejšie používaná na ďalšie purifikačné postupy.

Príklad 3

Konštrukcia kmeňa *E. coli* s teplotne senzitivnou trpS-alelou a mutáciami zabraňujúcimi normálnemu aktívnemu prenosu tryptofánu do bunky

Gény špecifikujúce rôzne systémy na aktívny prenos tryptofánu do *E. coli* boli identifikované, klonované a sekvencované /Sarsero, J. P., P. J. Wookey, P. Gollnick, C. Yanofsky and A. J. Pittard /1991/, J. Bacteriol., 173: 3231 - 3234; a Honore, N. and S. T. Cole /1990/, Nucleic Acids Research 18: 653/. Mutanty defektné v každom z týchto systémov /TnaB, Mtr a AroP/ boli tiež označené. Expresii TnaB proteínu sa zabránilo pomocou mutácie v tnaA-géne /tnaA1/, ktorý má polárny účinok na tnaB-expressiu /Stewart, V. and C. Yanofsky, /1985/, J. Bacteriol. 164: 731 - 740/. Toto je obzvlášť výhodná mutácia, pretože tnaA-gén, ktorý je tiež inaktivovaný, kóduje enzým tryptofanáz, ktorá by mohla degradovať tryptofán. Rôzne mutácie mtr-génu boli označené a mutanty boli selektované na základe rezistencie na tryptofánový analóg 5-metyltryptofán. Jedna taká mutácia mtr-24 bola pôvodne označená Higarem /Higare, S., K. Ito, T. Matsuyama, H. Ozeki and T. Yura /1968/ J. Bacteriol. 96: 1880 - 1881/.

Mutanty vo všeobecnom aromatickom prenosovom systéme môžu byť izolované aj pri selekcii podľa rezistencie na analógy aromatických aminokyselín. Mutácia aroP579 bola opísaná Brownom /Brown K. D. /1970/, J. Bacteriol. 104: 177 - 188/.

Kmeň, ktorý má mutáciu v trpS-géne a mutácie v každom z génov pre tryptofánové prenosové systémy, môže byť ľahko konštruovaný s použitím transpozónu Tn10 a fágovej P1-sprostredkovanej transdukcie. Prototrofný kmeň, W3110 bol infektovaný λTn10 transpozónom λNK370 a kolónie rezistentné na tetracyklín boli selektované a pomenované podľa Klecknera, N., D. F. Barker, D. G. Ross a D. Botstein, /1978/, Genetics 90: 427 - 450. S použitím P1 transdukcie boli získané izoláty, v ktorých Tn10 bol tesne pripojený k aroP519, mtr-24 a tnaAt. P1-lyzáty by mohli byť potom použité na zavedenie každej z týchto mutácií následne do trpS-kmeňa v kombinácii so selekciou derivátov

senzitívnych na tetracyklín podľa metódy Bochner, B. R., H. C. Huang, G. L. Shieven and B. N. Ames /1980/. J. Bacteriol. 143: 926 - 1033.

TrpS⁺-deriváty takých mutantov by mohli byť získané transdukciou s lyzátom z trpS⁺-klonu selektovaného podľa rastu na platniach obsahujúcich 0,5 mM tryptofánu pri 42 °C.

Príklad 4

Porovnanie rýchlostí rastu trpS378 a trpS⁺-kmeňov defektných v aktívnom prenose tryptofánu a v jeho biosyntéze

Tryptofánové auxotrofné formy, ktoré majú trpS-alelu divého typu a sú schopné aktívneho prenosu tryptofánu do bunkového rastu pri stálej rýchlosti v minimálnom médiu doplnenom tryptofanom s obsahom menej ako 5×10^{-5} M.

Tryptofánové auxotrofné formy defektné v aktívnom prenose tryptofánu potrebujú vyššie obsahy $\sim 10^{-3}$ M/ na optimálny rast, zatiaľ čo kmene, ktoré majú prídavné mutáciu trpS378, potrebujú koncentrácie vysoké, ako 5×10^{-3} M, predtým, ako sa dosiahne maximálna rýchlosť rastu.

Obrázok 1 porovnáva citlivosť rastu na tryptofán trpS378 a trpS⁺-derivátov tryptofánovej auxotrofnej formy / Δ trpLE1413, ktorá má aj mutácie inaktivujúce Mtr, AroP a TnaB proteíny. JP6006 je odvodená od JP4153 zavedením Δ trpLE1413 pomocou P1 transdukcie s použitím Tn10 ako pripojeného markera a izolácie derivátov senzitívnych na tetracyklín, následným zavedením sac⁺ pomocou P1 transdukcie s použitím P1-lyzátu pestovaného na sac⁺-kmeni GA122 /Alaeddinoglu, N. G. and H. P. Charles, /1979/, J. Gen. Microbiol. 110: 47 - 59/. JP4153 je aroF363 aroG103/FBR/ aroH371 /FBR/ trpE382/FBR/ trpR363 tyrR366 trpS378 aroP579 mtr24tna-1. JP7847 je trpS⁺-derivát JP6006 izolovaný P1 transdukciou.

Bunky sa rozmnožovali v minimálnom médiu doplnenom odlišnými obsahmi tryptofánu pri 32 °C. Rast sa meral pomocou optickej hustoty Klettovým kolorimetrom a zdvojnásobujúce sa časy boli vypočítané z exponenciálnej fázy každej krivky rastu.

Príklad 5

Účinok teploty a prídavku kvasinkového extraktu na stabilitu a produktivitu kmeňa

Stabilita kmeňa sa môže testovať pomocou merania produktivity tryptofánu a antranilátu kultúr v pretrepávaných bankách, 1 % sériových prenosov sa uskutočňuje každých 24 hodín. Biomasa je obmedzená na približne 0,4 mg/l pomocou koncentrácie fosfátu, pomocou fosfátu v kvasinkovom extrakte alebo pomocou zmesi týchto dvoch. Prechod každou bankou v súprave predstavuje 100-násobné rozmnoženie počtu buniek alebo 6,7 generácií.

Produktivita tryptofánu charakteristicky zostáva tesne pri 100 % normálnej hodnoty pre kmeň, so zanedbateľne detegovaným antranilátom pre mnohé bunky. V banke trochu vzdialenej po sériách tryptofánová produktivita všeobecne klesá náhle na 40 % - 50 %, so sprevádzajúcim sa výskytom antranilátu. Počty buniek indikovali, že prechod od vysokej produktivity tryptofánu so žiadnym antranilátom k nízkej produktivite tryptofánu s antranilátom zodpovedá nárastu segregantov alebo mutantov od 0 -10 % do 40 - 70 %.

Médium pre každý klon je pripravené zo sterilných zásobných roztokov, uvedených ďalej:

glukóza (20 %) alebo sacharóza (20 %)	10 ml
MOPS minimálne médium (x10)*	20 ml
B ₁ (tiamín) (0,01 %)	0,2 ml
fosfát (15 mM KH ₂ PO ₄)	2,0 ml
tetracyklín (10 mg/ml), ak je potrebný	0,2 ml
sterilná destilovaná voda	170 ml

*MOPS minimálne médium (x10) obsahuje na liter: 167,44 g MOPS, 1,41 g dihydrátu citrátu trisodného, 0,13 g FeSO₄·7H₂O, 19,2 g NH₄Cl, 4,0 g MgSO₄·7H₂O, 2,4 g KCl, 0,15 mg CaCl₂·2H₂O, a stopové prvky /14 µg CoCl₂·6H₂O, 5 µg CuSO₄·5H₂O, 48 µg H₃BO₃, 57 µg ZnSO₄·7H₂O, 32 µg MnCl₂·4H₂O a 8 µg (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O).

10 ml kultúry sa inokuluje čerstvou škvrnou testovaného kmeňa a inkubuje cez noc pri pretrepávaní pri 30 °C. Postup od transformácie až do tohto stupňa poskytuje približne 34 generácií, ktoré nie sú zahrnuté vo výpočtoch. Celonočná kultúra sa použije na inokuláciu prvej banky v sérii.

1 % transferov /100 µl v 10 ml/ sa uskutočňuje v 24 hodinových intervaloch, až kam produktivita kultúr tryptofánu neklesne, so súčasným výskytom kyseliny antranilovej. Za podmienok týchto experimentov každá kultúra dosiahne stacionárnu fázu skôr, ako je transformovaná a každá banka poskytuje približne 6,7 generácií. Tam, kde sa uďali dramatické zmeny v tryptofánovej hladine a hladine kyseliny antranilovej v šiestich bankách napríklad, stabilita by sa mohla uchovať až 5 x 6,7 alebo 33,5 generácií. Optická hustota 24 hodinovej kultúry sa meria v čase každého transferu, a vzorka sa centrifuguje a supernatant sa filtruje cez filter na jedno použitie /Mi/Millipore, 0,45 µm/ za použitia injekčnej striekačky. Koncentrácia tryptofánu a kyseliny antranilovej sa stanoví pomocou HPLC.

Meranie produktivity (Y p/x) v bankách

Testované kmene sa pestujú pri potrebnej teplote za pretrepávania a produktivita sa meria po 24 hodinách a 48 hodinách. Médium je také isté ako pri skúškach stability. 10 ml kultúry sa inokuluje čerstvou škvrnou a inkubuje cez noc za pretrepávania. Toto sa použije na inokulovanie testovanej banky obsahujúcej 15 ml toho istého média. Po 24 hodinách sa vzorka vyberie. Optická hustota sa meria pri 660 nm s použitím spektrofotometra a čistá hmotnosť sa vypočíta za použitia štandardnej krivky. Vzorka sa centrifuguje, filtruje a koncentrácia tryptofánu, tyrozínu a kyseliny antranilovej sa meria pomocou HPLC s použitím príslušných štandardov. Produktivita (Y p/x) sa definuje ako výťažok tryptofánu (g/l) delený výťažkom biomasy alebo čistou hmotnosťou (g/l).

Účinok teploty inkubácie tak na stabilitu, ako i na produktivitu pre nadproduktívny kmeň nesúci trpS378-alelu a plazmid nesúci trp-operón kódujúci spätnoväzbovo rezistentnú antranilátsyntetázu je znázornený na obrázku 2. Nízke teploty podporujú vysokú stabilitu a nízku produktivitu, zatiaľ čo vyššie teploty podporujú produktivitu na úkor stability. Toto sa môže prejavovať v rôznych produkčných kmeňoch s odlišnou primárnou selekciou. Údaje na obrázku 2 sú pre JP6015/pMU91 a primárna selekcia je pre Ser⁺. JP6015 je odvodený z JP4153 /pozri príklad 4/ pomocou zavedenia sac⁺ transdukciou a zavedenia serA⁺ kotransdukciou s tesne pripojeným Tn10 transpozónom, a sekvenčnej selekcie derivátov citlivých na tetracyklín. pMU91 je plazmid odvodený od pSC101 /Cohen, S. N. a A. C. Chang /1977/, J. Bacteriol. 132: 734 - 737/, nesúci Tc^R, trpE476DCBA a serA⁺ /pozri obrázok 9/. Alela trpE476DCBA sa izolovala za použitia špecializovaného transduktívneho fága φ80pt190h /Herschfield, V. et al /1974/, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 3455 - 3459/. Kmeň trpE⁻ nesúci 80pt190h sa pestoval na minimálnom médiu obsahujúcom 1 mM 5-metyltryptofánu/5MT/. V skupine buniek bola pomocou ultrafialového žiarenia vyvolaná produkcia lyzátu, ktorý sa použil v sekvenčnej transdukcii, selektujúcej Trp⁺5MT^R transduktanty. Niekoľko z nich sa analyzovalo na aktivitu antranilátsyntetázy a tr-

pE476DCBA-ale sa charakterizovala ako kódujúca antranilátsyntetázu so 70 % celkovej aktivity pri 10 mM L-tryptofánu. Gény *trp* sa klonovali na 7,9 kb *Xho*I/*Sal*I fragmente do *Xho*I miesta pSC101. Gén *serA*⁺ sa zaviedol do *Xho*I miesta na 2,9 kb *Sal*I fragmente.

Účinok prítomnosti alebo neprítomnosti kvasinkového extraktu tak na stabilitu, ako aj na produktivitu sa môže prejavovať v rôznych kmeňoch s nadproduktivitou tryptofánu. Údaje na obrázku 3 s použitím JP6015/pMU91 a *Ser*⁺ primárnej selekcie demonštrujú použitie kvasinkového extraktu na zníženie produktivity a zvýšenie stability.

Príklad 6

Produkcia tryptofánu pomocou *Escherichia coli* JP6015/pMU91

Jednotlivé kolónie kmeňa *Escherichia coli* K-12 JP6015/pMU91 sa produkovali na MM agare /pozri príklad 1/ doplnenom glukózou (2 g/l), kvasinkovým extraktom (5 g/l) a tetracyklínom (5 mg/l) za inkubácie pri 30 °C 48 hodín. Jedna vybratá kolónia sa ďalej rozmnožovala v 10 ml kultúry /100-mililitrová banka/ za inkubácie približne 16 hodín pri 30 °C a 250 otáčkach za minútu.

Médium pre kultúru bolo pripravené zo sterilných zásobných roztokov uvedených ďalej:

glukóza (20 %)	10 ml
MOPS minimálne médium (x10)	20 ml (pozri príklad 5)
kvasinkový extrakt (20 %)	1 ml
tetracyklín (10 mg/l)	0,05 ml
sterilná destilovaná voda	170 ml

Jeden ml tejto kultúry kmeňa *Escherichia coli* K-12 JP6015/pMU91 sa inokuloval do 300 ml očkovacieho média /zloženie pozri v tabuľke 1/ preneseného do Erlenmeyerovej banky s objemom 2000 ml a pestovalo sa za pretrepávania pri 30 °C 24 hodín na rotačnej trepačke pri 150 ot./min.

70 ml výslednej očkovacej kultúry sa inokulovalo do 700 ml prefermentačného média /zloženie pozri v tabuľke 2/ dávkaného v 2 l striasacom fermentéri a fermentácia sa uskutočňovala pri 30 °C 24 hodín. Hodnota pH 6,7 sa regulovala pomocou 25 % vodného roztoku amoniaku; pO_2 sa udržiaval nad 40 % prevzdušňovaním rýchlosťou 1/3 objemu za min. a miešaním rýchlosťou 280 až 380 ot./min.

Výsledná prekultúra s vonkajším priemerom 20 /merané pri 660 nm/ sa inokulovala do 6,3 l hlavného fermentačného média so zložením uvedeným v tabuľke 3, dávkaného v 10 l fermentéri.

Fermentácia sa uskutočňovala pri 33 °C s prevzdušňovaním pri 0,5 objemu za min. a udržiavania pO_2 nad 40 % za miešania kultúry pri 700 až 1200 ot./min; pH sa udržiavalo na 7,0 s použitím 25 % vodného roztoku amoniaku. Po 6,5 hodiny roztok so 620 g/l glukózy sa pridával kontinuálne do kultúry takým spôsobom, že koncentrácia glukózy vo fermentéri neprekročila hodnotu 17 g/l. Po 32 hodinách sa fermentácia ukončila. Obsah L-tryptofánu a vedľajších produktov L-fenylalanínu a L-tyrozínu, ktoré sa akumulovali, bol kvantitatívne stanovený pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie. Výsledky sú uvedené v tabuľke 4.

Príklad 7

Produkcia tryptofánu pomocou *Escherichia coli* JP4735/pMU3028

Jednotlivé kolónie kmeňa *Escherichia coli* K-12 JP4735/pMU3028 sa produkovali na MM agare /pozri príklad 1/ doplnenom glukózou (2 g/l), kvasinkovým extraktom (5 g/l) a tetracyklínom (2,5 mg/l) za inkubácie pri 30 °C 48 hodín. Jedna vybratá kolónia sa ďalej rozmnožovala v 10 ml kultúry /100-mililitrová banka/ za inkubácie približne 16 hodín pri 30 °C a 250 otáčkach za minútu.

Médium pre kultúru bolo pripravené zo sterilných zásobných roztokov uvedených ďalej:

glukóza (20 %)	10 ml
MOPS minimálne médium (x10)	20 ml (pozri príklad 5)
kvasinkový extrakt (20 %)	1 ml
tetracyklín (10 mg/l)	0,05 ml
sterilná destilovaná voda	170 ml

Jeden ml tejto kultúry kmeňa *Escherichia coli* K-12 JP4735/pMU3028 sa inokuloval do 300 ml očkovacieho média /zloženie pozri v tabuľke 1/ preneseného do Erlenmeyerovej banky s objemom 2000 ml a pestoval sa za pretrepávania pri 30 °C 24 hodín na rotačnej trepačke pri 150 ot./min.

70 ml výslednej očkovacej kultúry sa inokulovalo do 700 ml prefermentačného média /zloženie pozri v tabuľke 2/ dávkaného v 2 l striasacom fermentéri a fermentácia sa uskutočňovala pri 30 °C 24 hodín. Hodnota pH 6,7 sa regulovala pomocou 25 % vodného roztoku amoniaku; pO_2 sa udržiaval nad 40 % prevzdušňovaním rýchlosťou 1/3 objemu za min. a miešaním rýchlosťou 280 až 380 ot./min.

Výsledná prekultúra s vonkajším priemerom 20 /merané pri 660 nm/ sa inokulovala do 6,3 l hlavného fermentačného média so zložením uvedeným v tabuľke 3, dávkaného v 10 l fermentéri.

Fermentácia sa uskutočňovala pri 33 °C s prevzdušňovaním pri 0,5 objemu za min. a udržiavania pO_2 nad 40 % za miešania kultúry pri 700 až 1200 ot./min; pH sa udržiavalo na 7,0 za použitia 25 % vodného roztoku amoniaku. Po 6,5 hodiny roztok so 620 g/l glukózy sa pridával kontinuálne do kultúry takým spôsobom, že koncentrácia glukózy vo fermentéri neprekročila hodnotu 27 g/l. Po 45 hodinách sa fermentácia ukončila. Obsah L-tryptofánu a vedľajších produktov L-fenylalanínu a L-tyroakumulovaného L-tryptofánu sa kvantitatívne stanovil pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie. Výsledky sú uvedené v tabuľke 4.

Tabuľka 1

Zloženie očkovacieho média

monohydrát glukózy	4	g/l
kvasinkový extrakt	1,1	g/l
kyselina morfolinopropánsulfónová	16,7	g/l
dihydrát citrátu trisodného	0,14	g/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O	13	mg/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,4	g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,29	g/l
KCl	0,24	g/l
KH ₂ PO ₄	1,05	g/l
tiamín-hydrochlorid	5	mg/l
tetracyklín	2,5	mg/l
stopové prvky	2	ml/l

pH bolo nastavené pomocou 25 % vodného roztoku NH₄OH približne na hodnotu 7,0.

Stopové prvky obsahujú:

Na ₂ MoO ₄ ·H ₂ O	0,15	g/l
H ₃ BO ₃	2,5	g/l
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,7	g/l
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,25	g/l
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,6	g/l
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,3	g/l

Tabuľka 2

Zloženie prefermentačného média

monohydrát glukózy	27,5	g/l
kvasinkový extrakt	7,5	g/l
dihydrát citrátu trisodného	1	g/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1,1	g/l

MgSO ₄ ·7H ₂ O	3,15	g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	8,65	g/l
KH ₂ PO ₄	0,75	g/l
tiamín-hydrochlorid	24	mg/l
tetracyklín	2,5	mg/l
K ₂ SO ₄	2,3	g/l
stopové prvky (pozri tabuľka 1)	2	ml/l

Tabuľka 3

Zloženie hlavného fermentačného média		
monohydrát glukózy	27,5	g/l
dihydrát citrátu trisodného	1	g/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1,4	g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3,15	g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	8,65	g/l
KH ₂ PO ₄	1,5	g/l
K ₂ SO ₄	2,3	g/l
stopové prvky (pozri tabuľka 1)	4	ml/l

Tabuľka 4

Kmeň	L-tryptofán (g/l)	L-fenylalanín (g/l)	L-tyrozín (g/l)
JP6015/pMU91	18,3	1,0	0,8
JP4735/pMU3028	19,5	0	0

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Mutantné kmene *E. coli* so zvýšenou schopnosťou produkovať L-tryptofán zahŕňajúce vo svojom genóme mutantný gén kódujúci čiastočne defektnú tryptofanyl-tRNA-syntetázu, ktorý, keď je prítomný v neproduktívnom kmeni, je charakterizovaný tryptofánovou auxotrofiou závislou od teploty, a s ďalšími mutáciami na chromozóme v jednom alebo vo viacerých génoch selektovaných zo skupiny mtr, aroP, tnaA alebo tnaB.

2. Kmeni *E. coli* podľa nároku 1, kde uvedené mutácie majúce za následok defektné odvádzanie tryptofánu sú aroP579, mtr-24 a tnaA1.

3. Kmene *E. coli* podľa nároku 1 a 2, kde uvedený mutantný gén kódujúci čiastočne defektnú tryptofanyl-tRNA-syntetázu je trpS378-alela, ktorá sa dá získať z *E. coli* JP6006 deponovaného v DSM pod prírástkovým číslom DSM10118.

4. Kmene *E. coli* podľa nárokov 1 až 3, kde sú uvedené kmene transformované plazmidom nesúcim tryptofánový operón kódujúci enzým antranilátsyntetázu zbavenú späťnoväzbovej inhibície tryptofánom.

5. Kmene *E. coli* podľa nárokov 1 až 4, ktoré majú mutácie v jednom alebo vo viacerých génoch selektovaných zo skupiny trpEDCBA, ktoré, keď sú prítomné v neproduktívnom kmeni, udeľujú bunke tryptofánovú auxotrofiu.

6. Kmeň *E. coli* podľa nároku 4, kde uvedený plazmid je pMU3025 a nesie trpE483-alelu, pričom uvedený plazmid je charakterizovaný pomocou obrázka 6c a získateľný z *E. coli* JP6768/pMU3025 deponovaného v DSM pod prírástkovým číslom DSM10121.

7. Kmeň *E. coli* podľa nárokov 4 a 5, kde je uvedený plazmid pMU3028 a nesie trpE483-alelu, trpDCBA-gény a serA⁺, pričom uvedený plazmid je charakterizovaný pomocou obrázka 8 a získateľný z *E. coli* JP4735/pMU3028 deponovaného v DSM pod prírástkovým číslom DSM10122.

8. Kmeň *E. coli* podľa nárokov 3, 4 a 5, kde je uvedený plazmid pMU91 a nesie trpE476DCBA-gény a serA⁺, pričom uvedený plazmid je charakterizovaný pomocou obrázka 9 a získateľný z *E. coli* JP6015/pMU91 deponovaného v DSM pod prírástkovým číslom DSM10123.

9. Kmene *E. coli* podľa nárokov 1 až 8, ktoré majú mutáciu v jednom alebo viacerých z nasledujúcich génov: trpR, tyrR, serA, aroG dodávajúcim DAHP-syntetáze Phe rezistenciu k späťnoväzbovej inhibícii; trpE dodávajúcou antranilátsyntetáze rezistenciu k späťnoväzbovej inhibícii; a aroH dodávajúcou DAHP-syntetáze Trp rezistenciu k späťnoväzbovej inhibícii.

10. Spôsob stabilizácie charakteristík kmeňov *E. coli* podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že počas rastu inokula sa do genómu *E. coli* kmeňov zavedie mutantný gén kódujúci čiastočne defektnú tryptofanyl-tRNA-syntetázu, ktorý, keď je prítomný v neproduktívnom kmeni, je charakterizovaný tryptofánovou auxotrofiou závislou od teploty, a ďalej sa na chromozóm zavedú ďalšie mutácie v génoch aroP, mtr, tnaA alebo tnaB a uvedený kmeň sa kultivuje pri teplote v rozmedzí 27 °C až 30 °C.

11. Spôsob podľa nároku 10, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že uvedené mutácie sú v génoch aroP579, mtr-24 a tnaA1.

12. Spôsob podľa nárokov 10 a 11, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že uvedené kmene *E. coli* nesú plazmid.

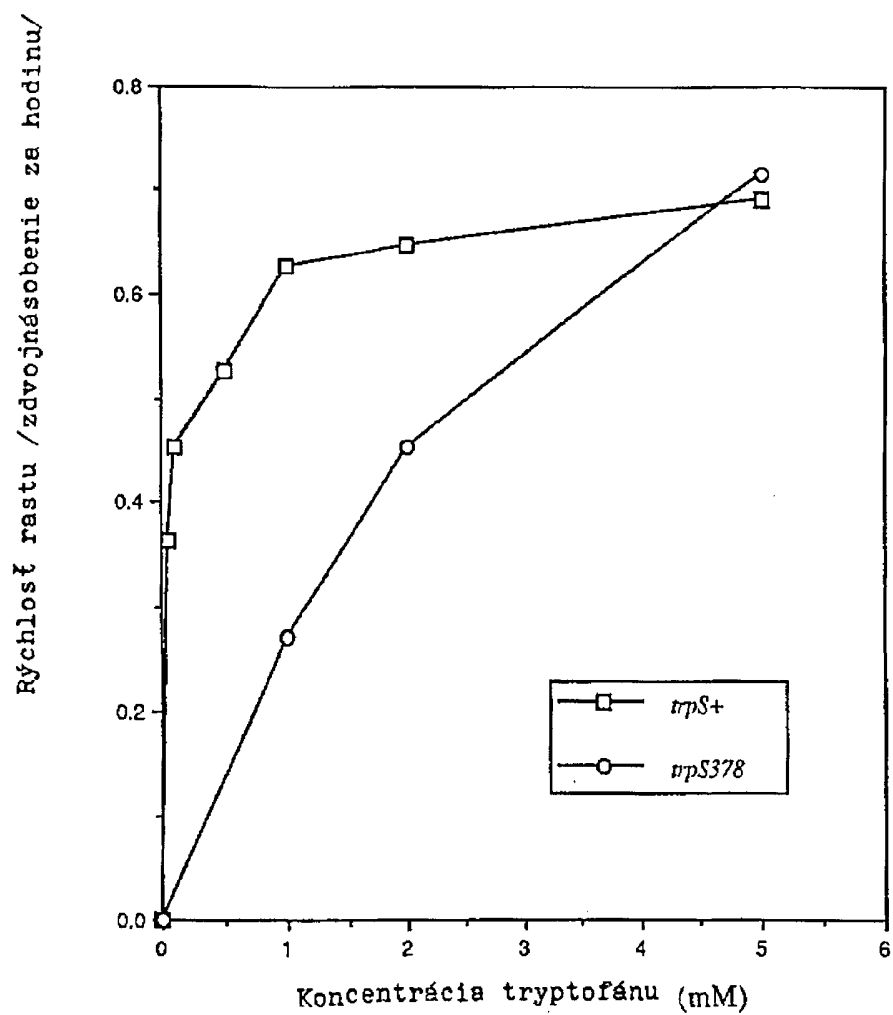
13. Spôsob podľa nároku 12, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že uvedený plazmid nesie trpE483-alelu.

14. Spôsob podľa nárokov 10 až 13, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že počas rastu inokula sa pridáva do kultivačnej pôdy kvasinkový extrakt.

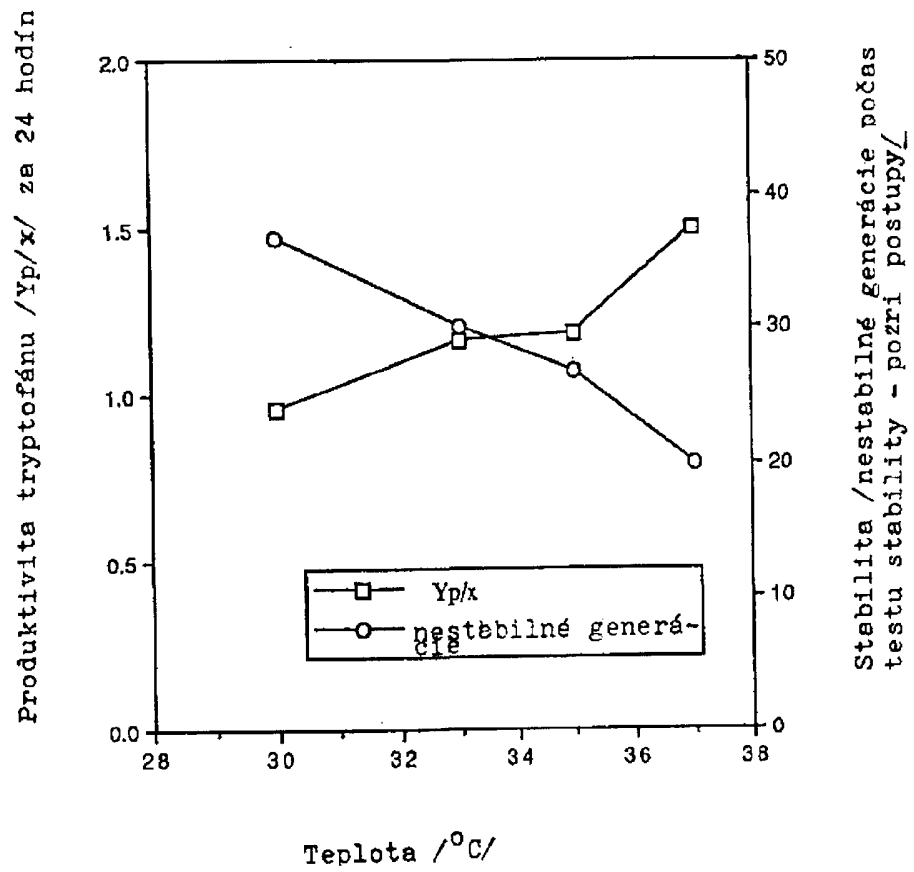
15. Spôsob produkcie L-tryptofánu fermentáciou, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že zahŕňa kultiváciu inokula kmeňov *E. coli* podľa nárokov 1 až 9 pri približne 30 °C prednostne za prítomnosti kvasinkového extraktu, pričom rast inokula sa limituje pomocou koncentrácie vhodného fosfátu v príslušnom rastovom médiu a fermentáciu pri teplote v rozsahu 33 °C až 37 °C za neprítomnosti kvasinkového extraktu a získanie tryptofánu akumulovaného vo výslednej kultivačnej kvapaline.

16. Spôsob produkcie L-tryptofánu podľa nároku 15, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že uvedená fermentácia sa uskutočňuje za neprítomnosti antibiotík.

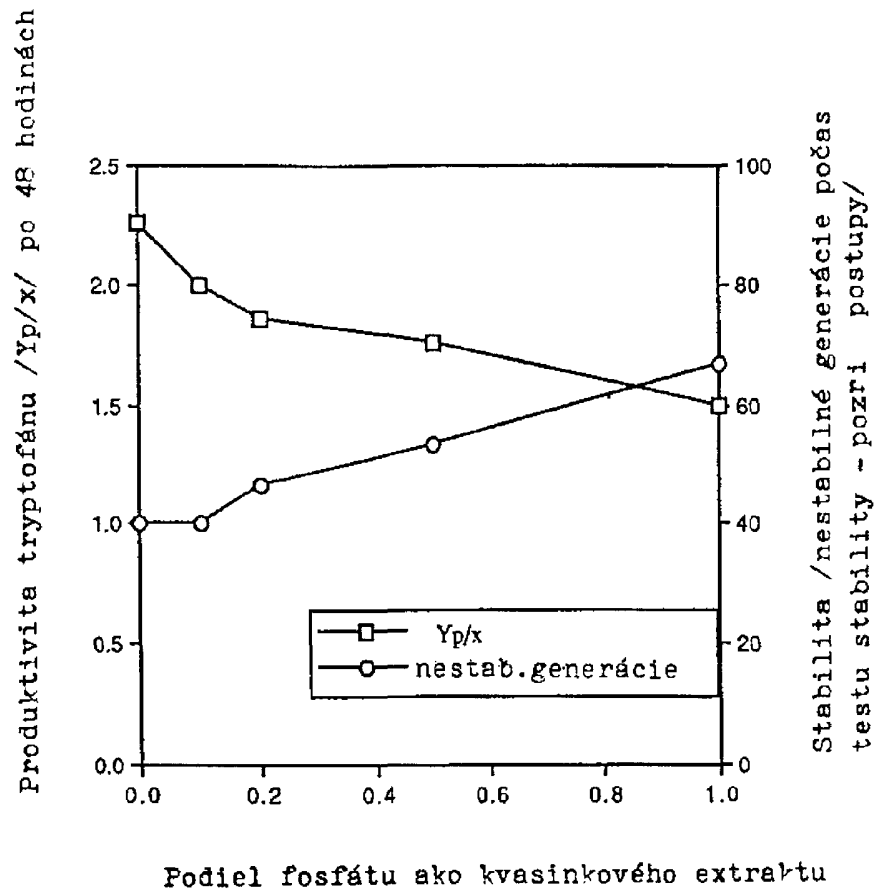
11 výkresov



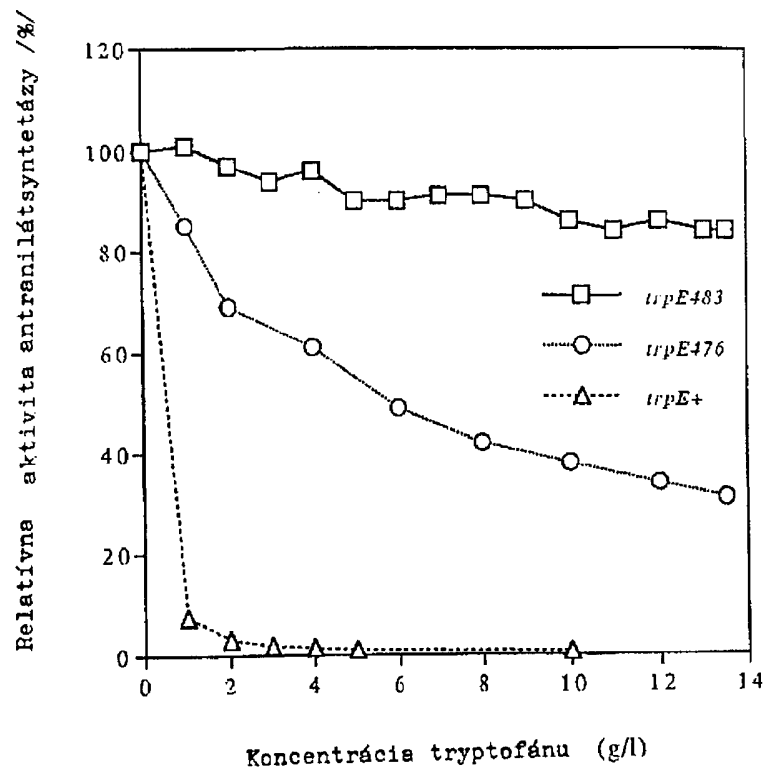
Obr. 1



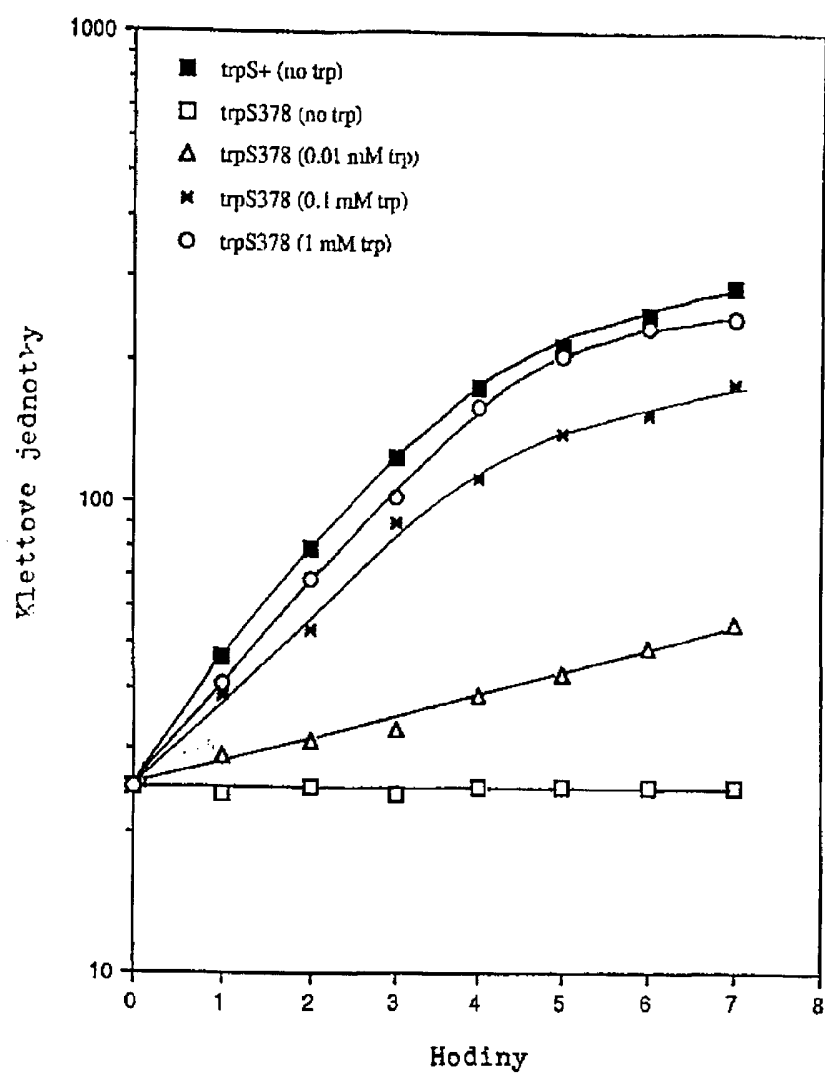
Obr. 2



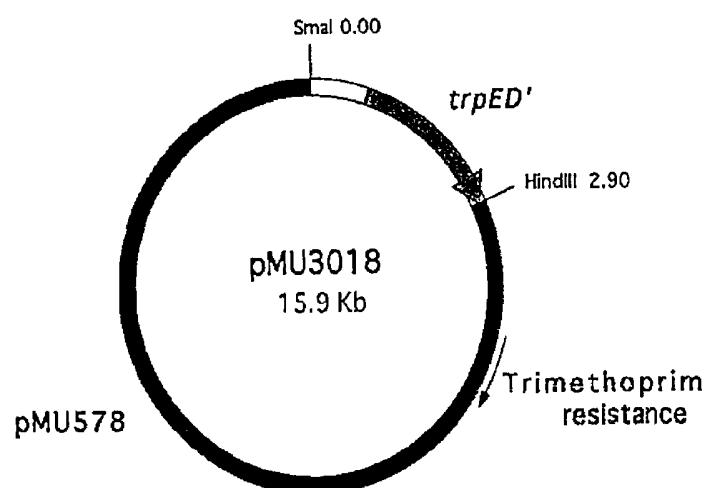
Obr. 3



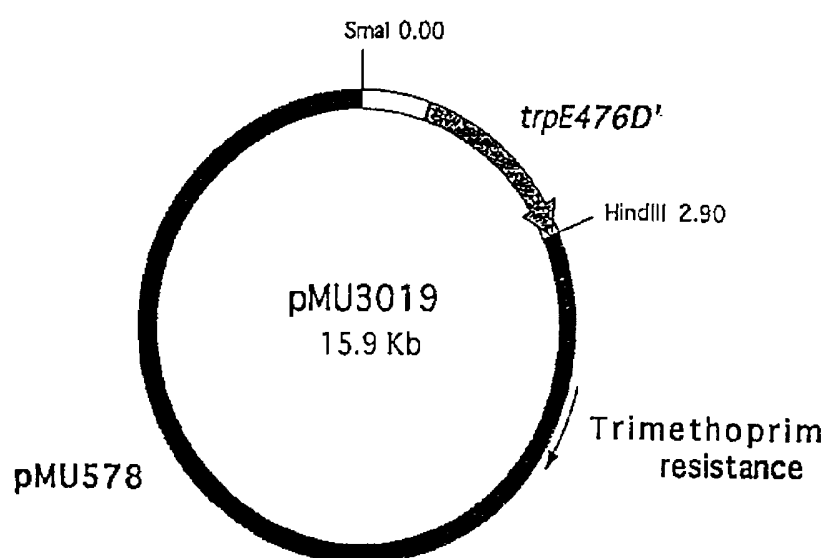
Obr. 4



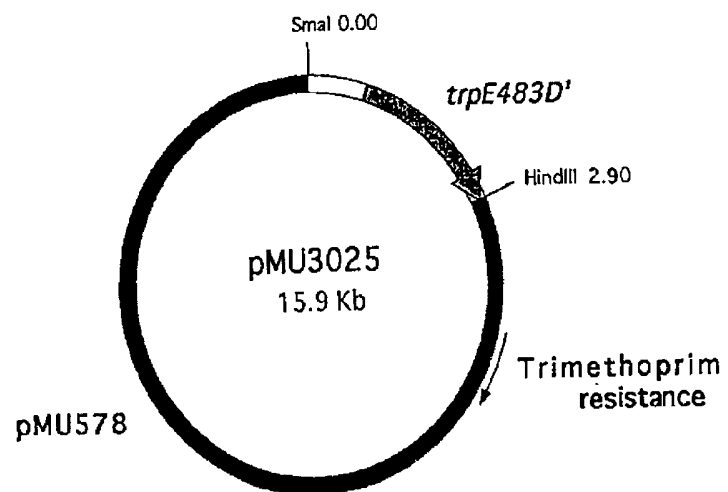
Obr. 5



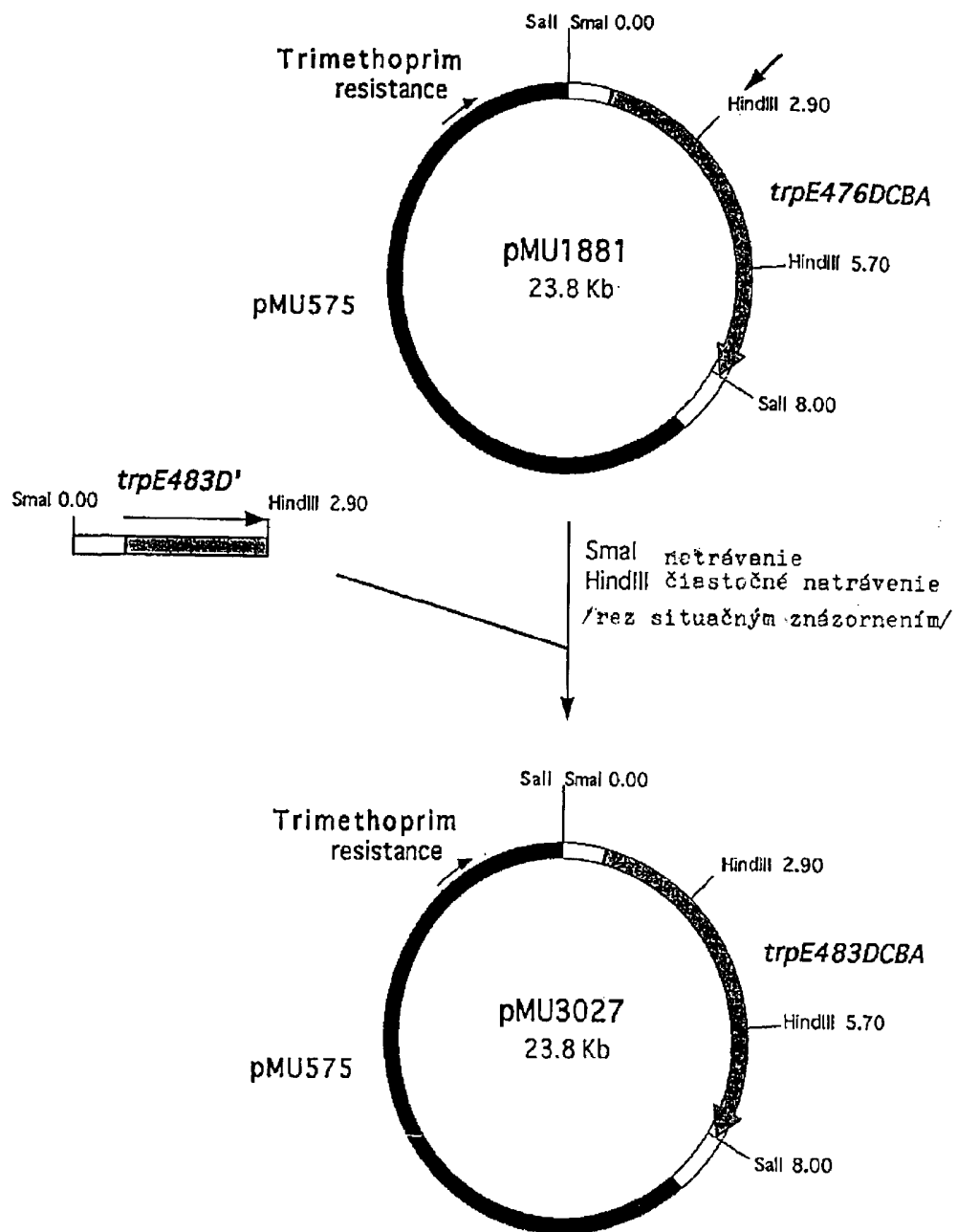
Obr. 6a



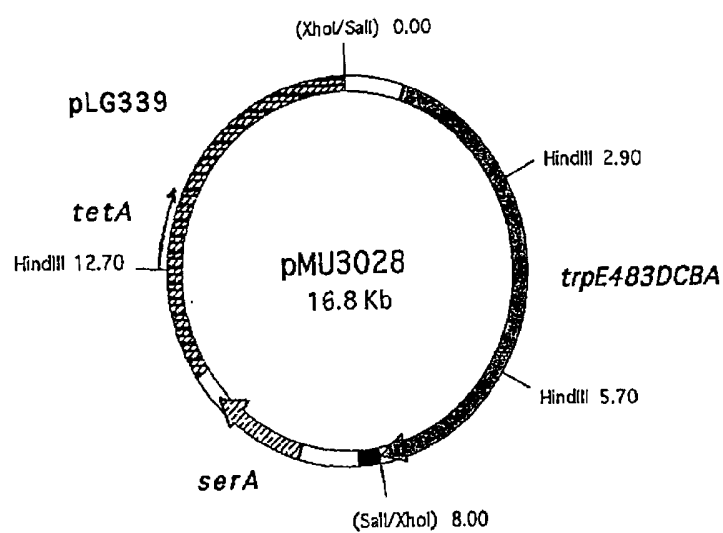
Obr. 6b



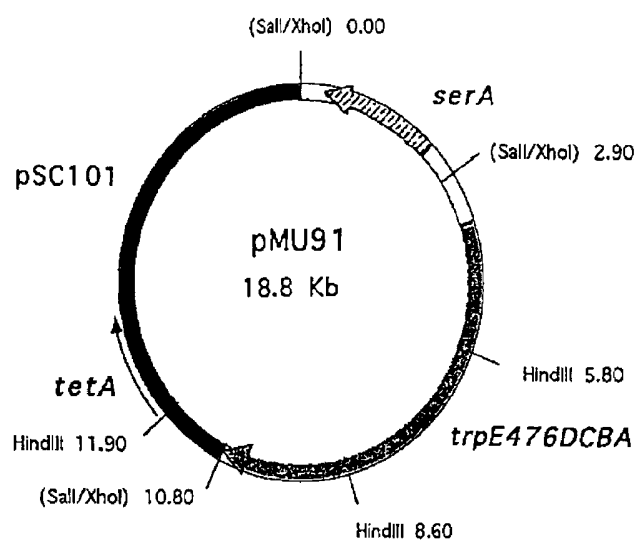
Obr. 6c



Obr. 7



Obr. 8



Obr. 9

Koniec dokumentu