



HU000227432B1

(19) **HU**(11) Lajstromszám: **227 432**(13) **B1****MAGYAR KÖZTÁRSASÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 05 01185**(22) A bejelentés napja: **2002. 01. 18.**(40) A közzététel napja: **2006. 10. 30.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2011. 06. 28.**(51) Int. Cl.: **C12N 9/04** (2006.01)**C12N 9/10** (2006.01)**C12P 13/02** (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/US 02/00925

(87) A nemzetközi közzétételi szám:

WO 02061108

(30) Elsőbbségi adatok:

60/263,053 2001. 01. 19. **US****60/262,995** 2001. 01. 19. **US****60/347,638** 2002. 01. 11. **US**

(72) Feltalálók:

Yocum, R. Rogers, Lexington, Massachusetts (US)**Patterson, Thomas A., Attleboro, Massachusetts (US)****Pero, Janice G., Lexington, Massachusetts (US)****Hermann, Theron, Kinnelon, New Jersey (US)**

(73) Jogosult(ak):

BASF Aktiengesellschaft, Ludwigshafen (DE)

(74) Képviselő:

Ráthonyi Zoltán, S.B.G. & K. Szabadalmi**Ügyvivői Iroda, Budapest**

(54)

Mikroorganizmusok és eljárások pantotenát fokozott termelésére

(57) Kivonat

A találmány tárgyát javított eljárások képezik fokozott pantoát és pantotenát termelésre olyan mikroorganizmusok alkalmazásával, amelyek módosított pantotenát bioszintetikus enzimaktivitással és módosított metilén-tetrahidrofolát (MTF) bioszintetikus enzimaktivitással rendelkeznek. A találmány tárgyát különösen olyan, a kívánt termék termelését fokozó eljárások képezik, amelyek a kulcsszerepet játszó köztes termék, ketopantoát szintjét emelik az annak szintézisében részt vevő enzimek segítségével. Rekombináns mikroorganizmusok és ezek tenyésztésének körülményei, valamint az ilyen mikroorganizmusok által előállított készítmények szintén a találmány oltalmi körébe tartoznak.

Mikroorganizmusok és eljárások pantotenát fokozott termelésére

A pantoténsavként vagy B5 vitaminként is ismert pantotenát a B vitamin család tagja és emlősök - beleértve lábasjószágot és az embert - tápanyag szükségletéhez tartozik (felvehető például táplálékból, vízzeloldható vitamin kiegészítésként vagy takarmány adalékként). A sejtekben a pantotenát elsősorban a koenzim A (CoA) és acil-hordozó fehérje (acyl carrier protein = ACP) bioszintéziséhez használandó fel. Ezek a koenzimek acil csoportok metabolizmusában működnek közre, amelyek ezen molekulák 4'-foszfo-pantetén részének szulfhidril csoportjával tioésztereket alkotnak. Ezek a koenzimek minden sejt számára nélkülözhetetlenek, a sejt anyagcseréjének több mint 100 különböző köztes reakciójában vesznek részt.

A pantotenát (különösen a bioaktív D izomer) szintézis hagyományos módja tömeg vegyszerek kémiai szintézisével olyan eljárás, amelynek gátat szab egyrészt a szubsztrát túl nagy költsége, másrészt a racém köztes termékek optikai felbontásának szükségessége. Ezért a kutatók manapság olyan bakteriális vagy mikrobiális rendszerek után kutatnak, amelyek a pantotenát bioszintézisben felhasználható enzimeket termelnek (illetve maguk a baktériumok képesek pantotenát szintetizálására). Különösen bio-konverziós eljárások értékelhetők kedvező termelési módként pantoténsav előnyben részesített izomerjeinek előállításában. To-

Dr. habil. L. Ester
2011. 01. 14

R

vábbá vizsgálják a közvetlen mikrobiológiai szintézis módszereit, mint a D-pantotenát előállítás megkönnyítésének eszközeit.

Az US 6,171,8451, EP 1 006 189 és WO 01/21772 számú szabadalmi iratokban közölnek pantotenát előállítására eljárásokat, amelyekben olyan mikroorganizmusokat alkalmaznak, melyekben a pantotenát szintézisben érintett génekben (*panB*, *panC*, *panD*, *panE*) és az izoleucin-valin szintézisben érintett génekben (*ilvEN*, *ilvC*, *ilvD*) különböző változtatások vannak.

Még mindig nagy szükség van azonban javított pantotenát termelő eljárásokra, főleg olyan mikrobiológiai eljárásokra, amelyek a kívánt termék magasabb hozama érdekében optimalizáltak.

A találmány tárgyát javított eljárások (például mikrobiológiai szintézisek) képezik pantotenát előállítására. Pantotenát előállítására irányuló eljárásokat leírtak olyan rokon alkalmazásokban, amelyeknek jellemzői például a pantotenát bioszintézis útvonal és az izoleucin-valin bioszintézis kulcsenzimjeit (lásd például az 1. ábrát) túlzottan kifejező, manipulált mikrobák. Olyan törzseket állítottak elő genetikai manipulációval, amelyek több, mint 50 g/l pantotenát előállítására képesek standard fermentációs eljárásokban (lásd például a WO 01/21772 közzétételi számú nemzetközi szabadalmi bejelentést). Különösen a *panB*, *panC*, *panD* és *panE* gének kifejeződésének növelése és az *ilvENC* és *ilvD* gének kifejeződésének növelése eredményezi azt, hogy a törzsek glükózt (piruvátot) kereskedelmileg jelentős mennyiségű pantotenáttá alakítják.

~~termelő törzseket ír le, amelyeket úgy manipuláltak, hogy minimalizálják a HMBPA-ként azonosított alternatív termék képződésében részt vevő különböző pantotenát bioszintetikus enzimek és/vagy izoleucin-valin bioszintetikus enzimek és/vagy ezek megfelelő szubsztrátjainak felhasználását.~~

A találmány tárgyát képezik a pantotenát termelés további fokozására irányuló módszerek, a pantotenát bioszintézis útvonalat szubsztráttal ellátó bioszintézis útvonal, nevezetesen a metilén-tetrahidrofolát („MTF”) bioszintézis útvonal módosítása révén. Főleg azt tártuk fel, hogy az MTF bioszintézis útvonal módosítása következtében MTF növekvő szintje a pantotenát bioszintézis kulcsszerepet játszó köztes termékének, ketopantoátnak megnövekedett szintjét eredményezi. A megnövekedett ketopantoát szint pedig jelentősen megnövekedett pantotenát termelési szintet eredményez a megfelelően manipulált törzsekben. Lényegében azonosítottunk egy limitáló lépést a panto-vegyületek (például pantotenát) termelődésében olyan törzsekben, amelyeket például a *panB*, *panC*, *panD*, *panE1*, *ilvBNC* és *ilvD* gének túlzott kifejezésére alakítottunk át, és itt olyan eszközöket írunk le, melyek segítségével elkerülhető ez a limitáció az MTF bioszintézis útvonal módosítása révén.

Az MTF bioszintézis útvonal módosításának legalább három hatékony módját írjuk le. Egyik szempontból bebizonyosodott, hogy megnövekedett szerin szint a pantotenátot termelő mikroorganizmusok tápközegében fokozott pantotenát képződést eredményez. Azt is kimutatták már, hogy 3-foszfoglicerát dehidrogenáz (a *serA* gén terméke) szintézisének vagy aktivitásának növelése vagy

szerin-hidroximetil transzferáz (a *glyA* gén terméke) szintézisének vagy aktivitásának növelése megfelelően átalakított mikroorganizmusokban a szerin és metilén-tetrahydrofolát bioszintézis fokozása révén növeli a panto-vegyületek termelődését.

Ennek megfelelően egy vonatkozásban a találmány tárgyát pantoát és pantotenát fokozott termelésére irányuló eljárások képezik, amelyek tartalmazzák módosított pantotenát bioszintetikus enzimaktivitásokkal és módosított metilén-tetrahydrofolát (MTF) bioszintetikus enzimaktivitásokkal rendelkező mikroorganizmusok tenyésztését olyan körülmények között, hogy a pantotenát termelődés fokozódik. A találmány tárgyát egy másik vonatkozásban pantoát és pantotenát fokozott termelésére irányuló eljárások képezik, amelyek tartalmazzák módosított pantotenát bioszintetikus enzimaktivitásokkal, módosított izoleucin-valin (*ilv*) bioszintetikus enzimaktivitásokkal és módosított metilén-tetrahydrofolát (MTF) bioszintetikus enzimaktivitásokkal rendelkező mikroorganizmusok tenyésztését olyan körülmények között, hogy a pantotenát termelődés fokozódik. A találmány tárgyát különösen kívánt termékek (például pantoát és/vagy pantotenát) fokozott termelésére irányuló eljárások képezik egy kulcsszerepet játszó köztes termék, ketopantoát szintjének az ennek szintézisében részt vevő enzimek segítségével történő emelésével. Előnyben részesített eljárások a mikroorganizmus 36 órás tenyésztése után több, mint 50 g/l, 60 g/l, 70 g/l vagy magasabb pantotenát szintet eredményeznek vagy a mikroorganizmus 36 órás tenyésztése után legalább 60 g/l, 70 g/l, 80 g/l, 90 g/l vagy több pantotenátot eredményeznek. Rekombináns mikroorganizmusok és ezek te-

nyésztése valamint az ilyen mikroorganizmusok által termelt készítmények szintén a találmány oltalmi körébe tartoznak.

A találmány egyéb előnyei nyilvánvalóvá válnak az itt következő részletes leírásból és a szabadalmi igénypontokból.

Az ábrák rövid leírása

1. ábra: a pantotenát és izoleucin-valin (ilv) bioszintézis útvonalak vázlatos ábrázolása. A pantotenát bioszintézis enzimeit vastagon jelöljük, a nekik megfelelő géneket dőlt betűkkel. Az izoleucin-valin (ilv) bioszintézis enzimeit vastag dőlt betűkkel jelöljük a nekik megfelelő géneket dőlt betűkkel.

2. ábra: a metilén-tetrahidrofolát („MTF”) bioszintézis útvonal vázlatos bemutatása *E. coli*-ban (és feltételezhetően *B. subtilis*-ben).

3. ábra: a pAN665 plazmid összeállításának vázlatos bemutatása.

4. ábra: a pAN670 plazmid összeállításának vázlatos bemutatása.

5. ábra: a pAN004 plazmid vázlatos bemutatása.

6. ábra: a pAN396 plazmid vázlatos bemutatása.

7. ábra: a pAN393 plazmid vázlatos bemutatása.

A találmány tárgyát panto-vegyületek (például ketopantoát, pantoát és/vagy pantotenát) előállítására irányuló javított eljárások és nevezett javított eljárásokban felhasználásra kerülő manipulált törzsek képezik. 50 g/l-nél több pantotenát előállítására képes törzsek létrehozhatók a WO 01/21772 közzétételi számú nemzetközi szabadalmi bejelentésben és a 60/262,995 sorozatszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben.

leírtak szerint. A *panB*, *panC*, *panD* és *panE1* gének kifejezésének növelésével és az *ilvBNC* és *ilvD* gének kifejezésének növelésével megtervezhetők olyan törzsek (például *Bacillus* törzsek), amelyek glükózt (piruvátot) kereskedelmileg vonzó mennyiségű pantotenáttá alakítanak át.

Feltártuk azonban, hogy a *panB* géntermékét, ketopantoát hidroximetil-transzferázt magas szinten kifejező törzsekben ~~(például PA824 törzsben, leírása az US 09/667,569 sorozatszámú szabadalmi bejelentésben és PA668-24 törzsben, leírása az US 60/262,995 sorozatszámú szabadalmi bejelentésben)~~ a pantotenáttermelés további növelésének limitáló lépése még az α -keto-izovalerát (α -KIV) konverziója ketopantoáttá. α -KIV szintézisét ^{fokozó} növelő módszereket írtak le a WO 01/21772 közzétételi számú nemzetközi szabadalmi bejelentésben, ~~és a 60/262,995 sorozatszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben~~. Mi közzétesszük, hogy a pantotenáttermelésben még további növekedés érhető el olyan manipulációval, amely MTF szintjeinek vagy MTF szintézis sebességének emelését célozza.

Ennek megfelelően a találmány tárgyát a metilén-tetrahydrofolát („MTF”) bioszintézis útvonal módosítása képezi. Különösen az MTF szintek növelése panto-vegyületeket termelő mikroorganizmusokban hatékony eszköz a ketopantoáttermelésének növelésében és fokozott pantoát és/vagy pantotenáttermelést eredményez megfelelően manipulált rekombináns mikroorganizmusokban.

Ketopantoát hidroximetil-transzferáz katalizálja a ketopantoát képződését α -keto-izovalerátból („ α -KIV”-ból) és MTF-ből (1. ábra). Az enzim főleg a hidroximetil-csoport transzferét ka-

talizálja MTF-ről α -KIV-re, ketopantoátot eredményezve. α -KIV és MTF egyaránt szubsztrátja ennek a reakciónak és ezek szintézise megnövelhető a ketopantoát képződés javítása érdekében. Az MTF bioszintézis útvonalat *E. coli*-ban (és feltételezhetően *B. subtilis*-ben) a 2. ábra mutatja be. MTF tetrahydrofolátból és szerinből szintetizálódik a *glyA* gén terméke – szerin hidroximetil-transzferáz – által katalizált reakcióban. Javított MTF szintézishez a sejteknek mindkét szubsztrátból és a *glyA* gén termékéből is megnövekedett mennyiségre van szükségük.

A találmány tárgyát egy megvalósítási formában fokozott pantotenát termelésre irányuló eljárások képezik, amelyek tartalmazzák (i) deregulált pantotenát bioszintézis útvonallal (például egy, kettő, három vagy négy deregulált pantotenát bioszintetikus enzimmal) és (ii) deregulált metilén-tetrahydrofolát (MTF) bioszintézis útvonallal (például legalább egy vagy két deregulált MTF bioszintetikus enzimmal) rendelkező mikroorganizmus tenyésztését olyan körülmények között, hogy a pantotenát képződés fokozódik. Példaként említhető pantotenát bioszintetikus enzimek közé tartoznak a ketopantoát hidroximetil-transzferáz, ketopantoát reduktáz, pantotenát szintetáz és aszpartát- α -dekarboxiláz. Példaként említhető MTF bioszintetikus enzimek közé tartoznak a *serA* és *glyA* gének termékei.

A találmány tárgyát egy másik megvalósítási formában fokozott pantotenát termelésre irányuló eljárások képezik, amelyek tartalmazzák (i) deregulált pantotenát bioszintézis útvonallal (például egy, kettő, három vagy négy deregulált pantotenát bioszintetikus enzimmal), (ii) deregulált izoleucin-valin (ilv)

bioszintézis útvonallal (például egy, kettő vagy három *ilv* bioszintetikus enzimmel) és (iii) deregulált metilén-tetrahydrofolát (MTF) bioszintézis útvonallal (például legalább egy vagy két deregulált MTF bioszintetikus enzimmel) rendelkező mikroorganizmus tenyésztését olyan körülmények között, hogy a pantotenát képződés fokozódik. Példaként említhető *ilv* bioszintetikus enzimek közé tartoznak az acetohidroxisav szintetáz, acetohidroxisav izomeroreduktáz és dihidroxisav dehidratáz.

A találmány tárgyát egy másik megvalósítási formában pantotenát termelésre irányuló eljárások képezik, amelyek tartalmazzák deregulált pantotenát bioszintézis útvonallal, deregulált *ilv* bioszintézis útvonallal és deregulált MTF bioszintézis útvonallal rendelkező, oly módon deregulált mikroorganizmus tenyésztését, hogy a mikroorganizmus 36 órás tenyésztése után legalább 50 g/l pantotenát képződik, előnyösen a mikroorganizmus 36 órás tenyésztése után legalább 60 g/l pantotenát képződik és még előnyösebben a mikroorganizmus 36 órás tenyésztése után legalább 70 g/l pantotenát képződik.

A találmány tárgyát egy másik megvalósítási formában pantotenát termelésre irányuló eljárások képezik, amelyek tartalmazzák deregulált pantotenát bioszintézis útvonallal, deregulált *ilv* bioszintézis útvonallal és deregulált MTF bioszintézis útvonallal rendelkező, oly módon deregulált mikroorganizmus tenyésztését, hogy a mikroorganizmus 48 órás tenyésztése után legalább 60 g/l pantotenát képződik, előnyösen a mikroorganizmus 48 órás tenyésztése után legalább 70 g/l pantotenát képződik és még előnyösebben a mikroorganizmus 48 órás tenyésztése után legalább 80

g/l pantotenát képződik.

A találmány tárgyát képezik továbbá a fent leírtak szerinti eljárások, ahol a pantotenát termelést tovább fokozzuk a pantotenát kináz aktivitás szabályozásával (például ahol a pantotenát kináz aktivitást csökkentjük). Egy megvalósítási formában CoaA deletált és CoaX aktivitása visszafogott. Egy másik megvalósítási formában CoaX deletált és CoaA aktivitása visszafogott. Egy még további megvalósítási formában CoaX és CoaA aktivitása visszafogott. A találmány tárgyát képezik továbbá a fentiek szerinti eljárások, amelyekben a mikroorganizmusokat szerin főlősleg körülményei között tenyésztjük. A találmány tárgyát képezik továbbá a fentiek szerinti eljárások, amelyekben a mikroorganizmusok pantotenát bioszintézis útvonala oly módon deregulált, hogy a pantotenát képződés β -alanin rátáplálástól független.

~~A találmány szerinti eljárásokkal szinterizált termékek szintén a találmány oltalmi körébe tartoznak, mivel olyan készítmények, amelyek a nevezett eljárások szerint előállított pantotenátot tartalmaznak.~~ A találmány szerinti eljárásokban felhasználásra kerülő rekombináns mikroorganizmusok szintén a találmány tárgyát képezik. Egy megvalósítási formában a találmány tárgya deregulált pantotenát bioszintézis útvonallal és deregulált MTF bioszintézis útvonallal rendelkező rekombináns mikroorganizmus pantotenát fokozott termelésére. Egy másik megvalósítási formában a találmány tárgya deregulált pantotenát bioszintézis útvonallal, deregulált MTF bioszintézis útvonallal és deregulált *ilv* bioszintézis útvonallal rendelkező rekombináns mikroorganizmus pantotenát fokozott termelésére. Továbbá a mik-

roorganizmusok pantotenát kináz aktivitása lehet csökkent. Előnyben részesített mikroorganizmusok a *Bacillus* nemzetségbe tartoznak, például *Bacillus subtilis*.

A fent leírtak szerint a találmány tárgyát bizonyos vonatkozásban panto-vegyületek (például pantoát és/vagy pantotenát) fokozott termelésére szolgáló eljárások képezik, amelyek tartalmazzák legalább deregulált pantotenát bioszintézis útvonallal rendelkező mikroorganizmusok tenyésztését. A „pantotenát bioszintézis útvonal” kifejezés magába foglalja a pantotenát kialakulásában vagy szintézisében felhasználásra kerülő pantotenát bioszintetikus enzimeket (például bioszintetikus enzimeket kódoló gének által kódolt polipeptideket), vegyületeket (például szubsztrátokat, intermediereket vagy termékeket), kofaktorokat és hasonlókat felölelő bioszintézis útvonalat. A „pantotenát bioszintézis útvonal” kifejezés ugyanúgy magába foglalja mikroorganizmusokban a pantotenát szintéziséhez (például *in vivo*) vezető bioszintézis útvonalat, mint a pantotenát *in vitro* szintéziséhez vezető bioszintézis útvonalat.

Az itt leírtak szerint a „deregulált pantotenát bioszintézis útvonallal rendelkező” mikroorganizmus olyan mikroorganizmusra utal, amelynek legalább egy pantotenát bioszintetikus enzimje oly módon deregulált (például túlzottan kifejezett) (mindkét kifejezést definiáljuk itt), hogy pantotenát termelődése fokozódik (nevezett mikroorganizmus pantotenát termelését összehasonlítva például nevezett bioszintetikus enzim deregulációja előtti pantotenát termelésével vagy vad típusú mikroorganizmus pantotenát termelésével). A „pantotenát” kifejezés a pantotenát

szabad savas formáját jelenti, utalunk rá a „pantoténsav” kifejezéssel is ugyanúgy, mint bármelyik sójával (amely a pantotenát vagy pantoténsav savas hidrogénjének kationnal, például kalciummal, nátriummal, káliummal, ammóniummal történő cseréjéből származik), „pantotenát sóként” is említve. A „pantotenát” kifejezés felöleli a pantotenát alkohol származékait is. Előnyben részesített pantotenát sók a kalcium-pantotenát és a nátrium-pantotenát. Előnyben részesített alkohol származék a pantotenol. A találmány szerinti pantotenát sók és/vagy alkoholok közé tartoznak az itt leírt szabad savakból hagyományos módszerekkel előállított sók és/vagy alkoholok. Egy másik megvalósítási formában a pantotenát sót közvetlenül egy találmány szerinti mikroorganizmussal szintetizáltatjuk. A találmány szerinti pantotenát só ehhez hasonlóan hagyományos módszerekkel átalakítható a pantotenát szabad savas formájává vagy pantoténsavvá. A „pantotenát” kifejezést gyakran rövidítjük „pan”-ként is itt.

A „deregulált pantotenát bioszintézis útvonallal rendelkező” mikroorganizmus előnyösen olyan mikroorganizmust jelent, amelynek legalább egy pantotenát bioszintetikus enzimje deregulált (például túlzottan kifejeződik) oly módon, hogy a pantotenát termelés 1 g/l vagy ennél nagyobb. Előnyösebben, a „deregulált pantotenát bioszintézis útvonallal rendelkező” mikroorganizmus olyan mikroorganizmust jelent, amelynek legalább egy pantotenát bioszintetikus enzimje deregulált (például túlzottan kifejeződik) oly módon, hogy a pantotenát termelés 2 g/l vagy ennél nagyobb. Még előnyösebben, a „deregulált pantotenát bioszintézis útvonallal rendelkező” mikroorganizmus olyan mikroorganizmust

jelent, amelynek legalább egy pantotenát bioszintetikus enzimje deregulált (például túlzottan kifejeződik) oly módon, hogy a pantotenát termelés 10 g/l, 20 g/l, 30 g/l, 40 g/l, 50 g/l vagy ennél nagyobb.

A „pantotenát bioszintetikus enzim” kifejezés felölel bármely enzimet, amely felhasználásra kerül a pantotenát bioszintézis útvonal egy vegyületének (például köztes terméknek) a kialakulásában. Például pantoát szintézise α -keto-izovalerátról (α -KIV) egy köztes terméken, ketopantoáton keresztül valósul meg. Ketopantoát kialakulását a pantotenát bioszintetikus enzim PanB vagy ketopantoát hidroximetil-transzferáz (a panB gén terméke) katalizálja. Pantoát képződését a pantotenát bioszintetikus enzim PanE1 vagy ketopantoát reduktáz (a panE1 gén terméke) katalizálja. β -alanin szintézisét aszpartátról a pantotenát bioszintetikus enzim PanD vagy aszpartát- α -dekarboxiláz (a panD gén terméke) katalizálja. Pantotenát képződését pantoátról és β -alaninból (például kondenzációval) a pantotenát bioszintetikus enzim PanC vagy pantotenát szintetáz (a panC gén terméke) katalizálja. Pantotenát bioszintetikus enzimek alternatív szerepet is játszhatnak a HMBPA bioszintézis útvonal enzimjeiként, az itt leírtak szerint.

Ennek megfelelően, a találmány tárgyát egy megvalósítási formában pantotenát fokozott termelésére irányuló eljárás képezi, amely tartalmazza legalább egy deregulált pantotenát bioszintetikus enzimmel (például oly módon deregulált, hogy fokozódik a pantotenát termelés) rendelkező mikroorganizmus tenyésztését, ahol nevezett enzimet ~~például~~ a PanB-t (vagy ketopantoát

hidroxilmetil-transzferázt), PanC-t (vagy pantotenát szintetázt), PanD-t (vagy aszpartát- α -dekarboxilázt) és PanEl-t (vagy ketopantoát reduktázt) tartalmazó csoportból választjuk. A találmány tárgyát egy másik megvalósításban pantotenát fokozott termelésére irányuló eljárás képezi, amely tartalmazza legalább két deregulált pantotenát bioszintetikus enzimmel rendelkező mikroorganizmus tenyésztését, ahol nevezett enzimet ~~például~~ a PanB-t (vagy ketopantoát hidroxilmetil-transzferázt), PanC-t (vagy pantotenát szintetázt), PanD-t (vagy aszpartát- α -dekarboxilázt) és PanEl-t (vagy ketopantoát reduktázt) tartalmazó csoportból választjuk. A találmány tárgyát egy másik megvalósításban pantotenát fokozott termelésére irányuló eljárás képezi, amely tartalmazza legalább három deregulált pantotenát bioszintetikus enzimmel rendelkező mikroorganizmus tenyésztését, ahol nevezett enzimet ~~például~~ a PanB-t (vagy ketopantoát hidroxilmetil-transzferázt), PanC-t (vagy pantotenát szintetázt), PanD-t (vagy aszpartát- α -dekarboxilázt) és PanEl-t (vagy ketopantoát reduktázt) tartalmazó csoportból választjuk. A találmány tárgyát egy másik megvalósításban pantotenát fokozott termelésére irányuló eljárás képezi, amely ~~tartalmazza legalább négy deregulált pantotenát bioszintetikus enzimmel rendelkező~~ mikroorganizmus tenyésztését, ~~például~~ a mikroorganizmus PanB-t (vagy ketopantoát hidroxilmetil-transzferázt), PanC-t (vagy pantotenát szintetázt), PanD-t (vagy aszpartát- α -dekarboxilázt) és PanEl-t (vagy ketopantoát reduktázt) tartalmaz deregulált formában.

A találmány tárgyát egy másik szempont szerint pantotenát

fokozott termelésére irányuló eljárás képezi, amely tartalmazza deregulált izoleucin-valin (ilv) bioszintézis útvonallal rendelkező mikroorganizmus tenyésztését. Az „izoleucin-valin bioszintézis útvonal” kifejezés magába foglalja azokat a bioszintézis útvonalon felhasználásra kerülő izoleucin-valin bioszintetikus enzimeket (például bioszintetikus enzimeket kódoló gének által kódolt polipeptideket), vegyületeket (például szubsztrátokat, intermediereket vagy termékeket), kofaktorokat és hasonlókat, amelyek a piruvát valinná vagy izoleucinná történő átalakulásában vesznek részt. Az „izoleucin-valin bioszintézis útvonal” kifejezésbe egyaránt beletartozik az a bioszintézis útvonal, amely valin vagy izoleucin szintéziséhez vezet mikroorganizmusokban (például *in vivo*) és a valin vagy izoleucin *in vitro* szintéziséhez vezető bioszintetikus útvonal.

Az itt leírtak szerint a „deregulált izoleucin-valin (ilv) bioszintézis útvonallal rendelkező” mikroorganizmus olyan mikroorganizmusra utal, amelynek legalább egy izoleucin-valin (ilv) bioszintetikus enzimje oly módon deregulált (például túlzottan kifejezett) (mindkét kifejezést definiáljuk itt), hogy izoleucin és/vagy valin és/vagy a valin prekursor α -keto-izovalerát (α -KIV) termelődése fokozódik (nevezett mikroorganizmus izoleucin és/vagy valin és/vagy α -KIV termelését összehasonlítva például nevezett bioszintetikus enzim deregulációja előtti vagy a vad típusú mikroorganizmus termelésével). Az 1. ábra vázlatosan ábrázolja az izoleucin-valin (ilv) bioszintézis útvonalat. Az izoleucin-valin bioszintetikus enzimeket vastag dőlt betűkkel és a nekik megfelelő géneket dőlt betűkkel tüntettük fel. Az „izoleucin-valin bioszintetikus enzim”

„izoleucin-valin bioszintetikus enzim” kifejezés felölel bármely enzimet, amely felhasználásra kerül az izoleucin-valin bioszintézis útvonal egy vegyületének (például köztes terméknek) a kialakulásában. Az 1. ábra szerint valin szintézise piruvátból az acetolaktát, α,β -dihidroxi-izovalerát (α,β -DHIV) és α -keto-izovalerát (α -KIV) köztes termékeken keresztül történik. Az acetolaktát kialakulását piruvátból az acetohidroxisav szintetáz (az *ilvBN* gén terméke vagy másik lehetőségként az *alsS* gén terméke) izoleucin-valin bioszintetikus enzim katalizálja. α,β -DHIV képződését acetolaktátból az acetohidroxisav izomeroreduktáz (az *ilvC* gén terméke) izoleucin-valin bioszintetikus enzim katalizálja. α -KIV szintézisét α,β -DHIV-ból a dihidroxisav dehidratáz (az *ilvD* gén terméke) izoleucin-valin bioszintetikus enzim katalizálja. Továbbá valin és izoleucin saját α -keto-vegyületükkel egymásba alakíthatók elágazó láncú aminosav transzaminázok segítségével. Az izoleucin-valin bioszintetikus enzimek alternatív szerepet is játszhatnak a HMBPA bioszintézis útvonal enzimjeiként, az itt leírtak szerint.

Ennek megfelelően, a találmány tárgyát egy megvalósítási formában pantotenát fokozott termelésére irányuló eljárás képezi, amely tartalmazza legalább egy deregulált izoleucin-valin (*ilv*) bioszintetikus enzimmel (például oly módon deregulált, hogy fokozódik a valin és/vagy izoleucin és/vagy α -KIV termelés) rendelkező mikroorganizmus tenyésztését, ahol nevezett enzimet az *IlvBN*-t, *AlsS*-t (acetohidroxisav szintetázt), *IlvC*-t (acetohidroxisav izomeroreduktázt) és *IlvD*-t (dihidroxisav dehidratázt) tartalmazó csoportból választjuk. Egy másik megvalósí-

tásban a találmány tárgyát pantotenát fokozott termelésére irányuló eljárás képezi, amely tartalmazza legalább két deregulált izoleucin-valin (ilv) bioszintetikus enzimmel rendelkező mikroorganizmus tenyésztését, ahol nevezett enzimek az IlvBN-t, AlsS-t (acetohidroxisav szintetázt), IlvC-t (acetohidroxisav izomero-reduktázt) és IlvD-t (dihidroxisav dehidratázt) tartalmazó csoportból ^{ki} választják ^{ett}. Egy másik megvalósításban a találmány tárgyát pantotenát fokozott termelésére irányuló eljárás képezi, amely tartalmazza legalább három deregulált izoleucin-valin (ilv) bioszintetikus enzimmel rendelkező mikroorganizmus tenyésztését, például nevezett mikroorganizmus deregulált formában tartalmazza IlvBN-t vagy AlsS-t (acetohidroxisav szintetázt), IlvC-t (acetohidroxisav izomero-reduktázt) és IlvD-t (dihidroxisav dehidratázt).

Az itt említettek szerint a pantotenát bioszintézis útvonal és/vagy az izoleucin-valin (ilv) bioszintézis útvonal enzimjeiről bebizonyosodott, hogy alternatív aktivitásuk létezik az [R]-3-(2-hidroxi-3-metil-butirilamino)-propionsav vagy 3-(2-hidroxi-3-metil-butirilamino)-propionsav („HMBPA”) bioszintézis útvonalon. Az „[R]-3-(2-hidroxi-3-metil-butirilamino)-propionsav („HMBPA”) bioszintézis útvonal” kifejezés olyan alternatív bioszintézis útvonalra utal, amely magába foglalja a pantotenát bioszintézis útvonalhoz és/vagy izoleucin-valin (ilv) bioszintézis útvonalhoz hagyományosan kapcsolódó, HMBPA kialakulásában vagy szintézisében felhasználásra kerülő bioszintetikus enzimeket és vegyületeket (például szubsztrátokat és hasonlókat). A „HMBPA bioszintézis útvonal” kifejezésbe ugyanúgy beletartozik a mikroorganiz-

musokban HMBPA szintéziséhez (például *in vivo*) vezető bioszintézis útvonal, mint a HMBPA *in vitro* szintéziséhez vezető bioszintézis útvonal.

A „HMBPA bioszintetikus enzim” kifejezés felölel bármely enzimet, amely felhasználásra kerül a HMBPA bioszintézis útvonal egy vegyületének (például köztes terméknek) a kialakulásában. Például a 2-hidroxi-izovaleriánsav (α -HIV) szintézisét α -keto-izovalerátról (α -KIV) a *panE1* és *panE2* géntermékek (*PanE1*-re ketopantoát reduktázként is utalunk itt) és/vagy az *ilvC* gén terméke (amelyre acetohidroxisav izomeroreduktázként is utalunk itt) katalizálják. HMBPA kialakulását β -alaninból és α -HIV-ből a *panC* gén terméke (amelyre pantotenát szintetázként is utalunk itt) katalizálja.

Az „[R]-3-(2-hidroxi-3-metil-butirilamino)-propionsav („HMBPA”)” kifejezés egyaránt jelenti a HMBPA szabad savas formáját, amelyet „[R]-3-(2-hidroxi-3-metil-butirilamino)-propionátként” is említünk és annak bármilyen sóját (amely a 3-(2-hidroxi-3-metil-butirilamino)-propionsav vagy 3-(2-hidroxi-3-metil-butirilamino)-propionát savas hidrogénjének például kalciummal, nátriummal, káliummal, ammóniummal történő cseréjéből származik), amelyre mint a „3-(2-hidroxi-3-metil-butirilamino)-propionsav sója” vagy „HMBPA sója” utalunk. Előnyben részesített HMBPA sók a kalcium-HMBPA vagy a nátrium-HMBPA. A találmány szerinti HMBPA sók közé tartoznak az itt leírt szabad savakból hagyományos módszerekkel előállított sók. A találmány szerinti HMBPA só ehhez hasonlóan hagyományos módszerekkel átalakítható a 3-(2-hidroxi-3-metil-butirilamino)-propionsav vagy 3-(2-hidroxi-

3-metil-butirilamino)-propionát szabad savas formájává.

A találmány tárgyát előnyben részesített megvalósításokban panto-vegyületek (például pantoát és/vagy pantotenát) fokozott termelésére irányuló eljárások képezik, amelyek tartalmazzák deregulált metilén-tetrahidrofolát (MTF) bioszintézis útvonallal rendelkező mikroorganizmus tenyésztését. A „metilén-tetrahidrofolát (MTF) bioszintézis útvonal” kifejezés olyan bioszintézis útvonalra utal, amelyben a PanB szubsztrátjának, MTF-nek a képződésében vagy szintézisében felhasználásra kerülő MTF bioszintetikus enzimek (például bioszintetikus enzimeket kódoló gének által kódolt polipeptidek), vegyületek (például szubsztrátok, intermedierek vagy termékek), kofaktorok és hasonlóak vesznek részt. A „metilén-tetrahidrofolát (MTF) bioszintézis útvonal” kifejezés ugyanúgy magába foglalja az MTF szintéziséhez *in vivo* vezető bioszintézis útvonalat (például a bioszintézis útvonalat *E. coli*-ban a 2. ábra szerint), mint az MTF *in vitro* szintéziséhez vezető bioszintézis útvonalat. A „metilén-tetrahidrofolát (MTF) bioszintetikus enzim” kifejezésbe beletartozik minden olyan enzim, amely felhasználásra kerül a metilén-tetrahidrofolát (MTF) bioszintézis útvonal egy vegyületének (például köztes terméknek vagy terméknek) képződésében.

A találmány – legalább részben – azon a felfedezésen alapul, hogy bizonyos MTF bioszintetikus enzimek deregulációja fokozott MTF termelődést eredményez. Azt az MTF bioszintetikus enzimet, amelynek deregulációja fokozott MTF képződést eredményez, „MTF bioszintézist fokozó enzimnek” nevezzük. Példaként említhető „MTF bioszintézist fokozó enzimek” a *serA* gén terméke (3-

foszfoglicerát dehidrogenáz) és a glyA gén terméke (szerin hidroximetil transzferáz). „Deregulált metilén-tetrahydrofolát (MTF) bioszintézis útvonallal rendelkező” mikroorganizmus olyan mikroba, amely legalább egy MTF bioszintézist fokozó enzimet deregulált formában (például túlzottan kifejezve) tartalmaz oly módon, hogy MTF termelése vagy bioszintézise fokozódik (például nevezett mikroorganizmusban nevezett bioszintetikus enzim deregulálását megelőző MTF termeléssel vagy a vad típusú mikroorganizmus MTF termelésével összehasonlítva).

Egy megvalósítási formában a találmány tárgyát panto-vegyületek (például pantoát és/vagy pantotenát) fokozott termelésére irányuló eljárás képezi, amely tartalmazza az itt definiáltak szerinti deregulált „metilén-tetrahydrofolát (MTF) bioszintézis útvonallal” rendelkező mikroorganizmus tenyésztését. A találmány tárgyát egy másik megvalósítási formában panto-vegyületek (például pantoát és/vagy pantotenát) fokozott termelésére irányuló eljárás képezi, amely tartalmazza deregulált MTF bioszintézist fokozó enzimmel rendelkező mikroorganizmus tenyésztését. A találmány tárgyát előnyben részesített megvalósítási formákban panto-vegyületek (például pantoát és/vagy pantotenát) fokozott termelésére irányuló eljárás képezi, amely tartalmazza deregulált glyA géntermékkel (szerin hidroximetil transzferázzal) és/vagy deregulált serA géntermékkel (3-foszfoglicerát dehidrogenázzal) rendelkező mikroorganizmus tenyésztését.

A találmány tárgyát még további vonatkozásban pantotenát fokozott termelésére irányuló eljárások képezik, amelyek tartal-

mazzák mikroorganizmusok tenyésztését pantotenát képződésének elősegítésére kiválasztott tenyésztési körülmények között, például a mikroorganizmus tenyésztését szerint (glyA szubsztrátját) főlöslegben tartalmazó tápközegben. A „szerin fölösleg” kifejezés olyan szerin mennyiségre utal, amely a szóban forgó mikroorganizmus tenyésztésénél szokásosan alkalmazott szerin szinthez képest megnövelt vagy nagyobb szerin mennyiség. Például a példákban leírt a *Bacillus* mikroorganizmus tenyésztése szokásosan körülbelül 0-2,5 g/l szerin jelenlétében történik. Ennek megfelelően a szerin fölösleg 2,5 g/l-nél nagyobb mennyiségű szerint, előnyösen körülbelül 2,5-10 g/l szerint jelent. Szerin fölösleg jelenthet 5 g/l-nél nagyobb mennyiségű szerint, például körülbelül 5-10 g/l szerint.

Egy még további megvalósítási formában az itt leírt mikroorganizmusokat olyan körülmények között tenyésztjük, hogy tovább növekedjen a pantotenát termelés. Például a pantotenát és/vagy izoleucin-valin (ilv) bioszintézis útvonal itt definiált prekursorainak és/vagy köztes termékeinek növelésével (például mikroorganizmusokat β -alanin, valin és/vagy α -KIV fölöslegének jelenlétében tenyésztve), ~~vagy másik lehetőségként β -alanin betáplálás nélkül jelentős mennyiségű β -alanint termelni képes mikro-~~
~~organizmus (azaz az US 09/09/667,569 sorozatszámú szabadalmi be-~~
~~jelentésben leírtak szerinti β -alanintól független mikroorganiz-~~
~~mus) tenyésztésével.]~~ (10)

A találmány tárgyát még további megvalósítási formában a pantotenát kináz aktivitás további szabályozása képezi pantotenát termelő törzsekben oly módon, hogy a pantotenát termelés fo-

kozódik. A pantotenát kináz kulcs enzim a pantotenát → koenzimA (CoA) átalakulás katalizálásában. ~~US 09/09/667,569 sorozatszámú szabadalmi bejelentés~~ Pantotenát kináz szabályozása (például a pantotenát kináz aktivitásának vagy szintjének csökkentésével) csökkenti a CoA termelést, kedvezve a pantotenát felhalmozódásnak. Egy megvalósítási formában a pantotenát kináz aktivitást csökkentjük CoaA deléciójával és CoaX aktivitás visszafogásával (CoaA és CoaX egyaránt képes katalizálni a CoA bioszintézis első lépését bizonyos mikroorganizmusokban). Egy másik megvalósítási formában a pantotenát kináz aktivitást CoaX deléciójával és CoaA aktivitás visszafogásával csökkentjük. Egy még további megvalósítási formában a pantotenát kináz aktivitást CoaA és CoaX aktivitásának visszafogásával csökkentjük (lásd WO 01/21772).

A találmány különböző vonatkozásait a továbbiakban a következő alfejezetekben részletezzük.

I. Különböző pantotenát és/vagy izoleucin-valin (ilv) és/vagy metilén-tetrahidrofolát (MTF) bioszintetikus enzimeket kódoló gének célba juttatása

A találmány tárgyát egy megvalósítási formában a pantotenát és/vagy izoleucin-valin (ilv) és/vagy metilén-tetrahidrofolát (MTF) bioszintézis útvonalak különböző bioszintetikus enzimjeinek célba juttatása vagy módosítása képezi. A találmány tárgyát különösen nevezett útvonalakhoz kapcsolódó különböző enzimes aktivitások módosítása vagy nevezett bioszintetikus enzimeket kódoló gének megváltoztatása képezi.

Az itt leírtak szerint a „gén” kifejezés olyan nukleinsav molekulát jelent (például DNS molekulát vagy annak szegmensét),

amely egy szervezetben gének közötti DNS-sel (azaz a gént a szervezet kromoszómális DNS-ében természetes körülmények között szegélyező és/vagy egymástól elválasztó közbenső vagy térközi DNS-sel) elválasztható más géntől vagy más génektől. Másik lehetőségként a gén csekély mértékben átfedhet egy másik génnel (például az első gén 3'-vége átfed a második gén 5'-végével), az egymással átfedő gének más génektől gének közötti DNS-sel választhatók el. A gén közvetlenül szintetizálhat enzimet vagy egyéb fehérje molekulát (például tartalmazhat kódoló szekvenciákat, például összefüggő nyílt leolvasási keretet (open reading frame = ORF), amely fehérjét kódol) vagy önmaga játszhat szerepet a szervezetben. Egy szervezetben a gének csoportosulhatnak az itt leírtak szerint egy operonon, nevezett operont más génektől és/vagy operonoktól a gének közötti DNS választja el. Az itt leírtak szerint „izolált gén” olyan génre utal, amely lényegében mentes azoktól a szekvenciáktól, amelyek természetes körülmények között szegélyezik a gént annak a szervezetnek a kromoszómális DNS-ében ahonnan a gén származik (azaz mentes második vagy elkülönülő fehérjét kódoló szomszédos kódoló szekvenciáktól, szomszédos struktúrális szekvenciáktól és hasonlóktól) és adott esetben tartalmaz 5' és 3' szabályozó szekvenciákat, például promóter szekvenciákat és/vagy terminátor szekvenciákat. Egy megvalósítási formában az izolált gén túlnyomórészt fehérjét kódoló szekvenciákat tartalmaz (például *Bacillus* fehérjéket kódoló szekvenciákat). Egy másik megvalósítási formában az izolált gén tartalmaz fehérjét kódoló szekvenciákat (például *Bacillus* fehérjét kódoló szekvenciákat) és szomszédos 5' és/vagy 3' szabályozó

szekvenciákat annak a szervezetnek a kromoszómális DNS-éből, amelyből a gén származik (például szomszédos 5' és/vagy 3' *Bacillus* szabályozó szekvenciákat). Az izolált gén előnyösen kevesebb, mint körülbelül 10 kb, 5 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb, 0,2 kb, 0,1 kb, 50 bp, 25 bp vagy 10 bp olyan nukleotid-szekvenciát tartalmaz, amely természetes körülmények között szegélyezi a gént annak a szervezetnek a kromoszómális DNS-ében, amelyből a gén származik.

Az „operon” legalább két egymással szomszédos gént vagy ORF-t foglal magába, adott esetben egymást átlapolva legalább az egyik gén vagy ORF 5' vagy 3' végi szekvenciájánál. Az „operon” kifejezés a génkifejeződés egy koordinált egysége, amely promótert és esetleg szabályozó elemet tartalmaz egy vagy több szomszédos génhez vagy ORF-hez kapcsolva (például bioszintetikus enzimeket kódoló struktúr gének). A gének (például struktúr gének) kifejeződése lehet koordináltan szabályozott, például szabályozó fehérjék szabályozó elemekhez történő kötődése vagy transzkripció anti-terminációja révén. Egy operon génjei (például struktúr gének) átírhatók az összes fehérjét kódoló egyszálú mRNS-be.

„Mutációt szenvedett gén” vagy „mutáns gén” kifejezések az itt leírtak szerint olyan nukleotid-szekvenciával rendelkező génre utalnak, amelyben legalább egy módosítás (például szubsztitúció, inszerció, delécio) van és nevezett mutáns által kódolt polipeptid vagy fehérje a vad típusú nukleinsav molekula vagy gén által kódolt polipeptid vagy fehérje aktivitásától eltérő aktivitást mutat. Egy megvalósítási formában a mutáns gén által kódolt polipeptid vagy fehérje megnövekedett aktivitást mutat a

vad típusú gén által kódolt polipeptiddel vagy fehérjével összehasonlítva, a meghatározást hasonló körülmények között végezve (például ugyanazon a hőmérsékleten tenyésztett mikroorganizmusokban vizsgálva). A „megnövekedett aktivitás” vagy „megnövekedett enzimaktivitás” azt jelenti, hogy az aktivitás legalább 5%-kal nagyobb, mint a vad típusú nukleinsav molekula vagy gén által kódolt polipeptid vagy fehérje aktivitása, előnyösen legalább 5-10%-kal, előnyösebben legalább 10-25%-kal, még előnyösebben legalább 25-50%-kal, 50-75%-kal vagy 75-100%-kal nagyobb, mint a vad típusú nukleinsav molekula vagy gén által kódolt polipeptid vagy fehérje aktivitása. A fent megadott értékek közé eső tartományok, például 75-85%, 85-90%, 90-95% szintén a találmány oltalmi körébe tartoznak. A „megnövekedett aktivitás” vagy „megnövekedett enzimaktivitás” azt is jelentheti, hogy az aktivitás legalább 1,25-szöröse a vad típusú gén által kódolt polipeptid vagy fehérje aktivitásának, előnyösen legalább 1,5-szöröse, előnyösebben legalább 2-szerese és még előnyösebben legalább 3-szorosa, 4-szerese, 5-szöröse, 10-szerese, 20-szorosa, 50-szerese, 100-szorosa a vad típusú gén által kódolt polipeptid vagy fehérje aktivitásának.

Egy másik megvalósítási formában a mutáns gén által kódolt polipeptid vagy fehérje csökkent aktivitást mutat a vad típusú gén által kódolt polipeptiddel vagy fehérjével összehasonlítva, a meghatározást hasonló körülmények között végezve (például ugyanazon a hőmérsékleten tenyésztett mikroorganizmusokban vizsgálva). Az is előfordulhat, hogy a mutáns gén nem kódol polipeptidet vagy a vad típusú polipeptid csökkentett szintjét termeli.

A „csökkent aktivitás” vagy „csökkent enzimaktivitás” azt jelenti, hogy az aktivitás legalább 5%-kal kisebb, mint a vad típusú nukleinsav molekula vagy gén által kódolt polipeptid vagy fehérje aktivitása, előnyösen legalább 5-10%-kal, előnyösebben legalább 10-25%-kal, még előnyösebben legalább 25-50%-kal, 50-75%-kal vagy 75-100%-kal kisebb, mint a vad típusú nukleinsav molekula vagy gén által kódolt polipeptid vagy fehérje aktivitása. A fent megadott értékek közé eső tartományok, például 75-85%, 85-90%, 90-95% szintén a találmány oltalmi körébe tartoznak. Az itt leírtak szerint a „csökkent aktivitás” vagy „csökkent enzimaktivitás” jelenthet deletált vagy „knock out” aktivitást is (például körülbelül 100%-kal kisebb aktivitást, mint a vad típusú nukleinsav molekula vagy gén által kódolt polipeptid vagy fehérje aktivitása).

Az aktivitás a szóban forgó fehérjére jól bevált, bármely aktivitás méréssel meghatározható. Az aktivitás mérhető közvetlenül, például sejtből vagy mikroorganizmusból izolált vagy tisztított fehérje aktivitásának mérésével. Másik lehetőségként az aktivitás mérhető vagy meghatározható a sejten vagy mikroorganizmuson belül, vagy extracelluláris közegben. Például mutáns gén (azaz nevezett mutáns által kódolt csökkent enzimaktivitás) meghatározása elvégezhető a mutáns gén mikroorganizmusban történő kifejezésével – például olyan mutáns mikroorganizmusban, amelyben az enzim hőérzékeny – és a mutáns gén vizsgálatával, vajon képes-e komplementálni a hőérzékeny (temperature sensitive = Ts) mutáns enzimaktivitását. „Megnövekedett enzimaktivitást” kódoló mutáns gén lehet az, amelyik a Ts mutánst hatékonyabban

komplementálja, mint például a megfelelő vad típusú gén. „Csökkent enzimaktivitást” kódoló mutáns gén lehet az, amelyik a Ts mutánst kevésbé hatékonyan komplementálja, mint például a megfelelő vad típusú gén.

A szakember képes megítélni, hogy akár egy egyedi szubsztitúció a nukleinsavban vagy génben (például a megfelelő aminosav-szekvenciában aminosav cserét kódoló bázis szubsztitúció) drámaian befolyásolhatja a kódolt polipeptid vagy fehérje aktivitását összevetve a vad típusú polipeptiddel vagy fehérjével. Az itt definiáltak szerinti mutáns gén (például mutáns polipeptidet vagy fehérjét kódoló) könnyen megkülönböztethető homológ fehérjét kódoló nukleinsavtól vagy géntől, mivel a mutáns gén megváltozott aktivitással rendelkező fehérjét vagy polipeptidet kódol, amely adott esetben eltérő fenotípusként figyelhető meg abban a mikroorganizmusban, amely kifejezi a nevezett mutáns gént vagy termeli a nevezett mutáns fehérjét vagy polipeptidet (azaz a mutáns mikroorganizmusban) összevetve a vad típusú gént kifejező mikroorganizmussal. Ennek ellenére a homológ fehérje rendelkezhet azonos vagy lényegében hasonló aktivitással, adott esetben fenotípusosan nem észrevehető, ha mikroorganizmusban termelődik, összevetve a vad típusú gént kifejező mikroorganizmussal. Ennek megfelelően nem a szekvencia azonosság mértéke a döntő nukleinsav molekulák, gének, fehérjék vagy polipeptidek esetében a homológok és mutánsok megkülönböztetésénél, hanem inkább a kódolt fehérje vagy polipeptid aktivitása az, amely megkülönbözteti egymástól a homológokat és mutánsokat: például kevés szekvencia azonosságot (például 30-50% szekvencia azonosságot) mutató homo-

lógoknak lehet lényegében ekvivalens funkcionális aktivitásuk, míg például 99%-os szekvencia azonosságot mutató mutánsok rendelkezhetnek drámaian eltérő vagy megváltozott funkcionális aktivitással.

A szakember számára az is nyilvánvaló, hogy a találmányban felhasználásra kerülő nukleinsav molekulák, gének, fehérjék vagy polipeptidek származhatnak bármilyen, HMBPA bioszintézis útvonallal, *ilv* bioszintézis útvonallal vagy pantotenát bioszintézis útvonallal rendelkező mikroorganizmusból. Ilyen nukleinsav molekulákat, géneket, fehérjéket vagy polipeptideket a szakember ismert technikák – úgymint homológia screenelés, szekvencia összehasonlítás és hasonlók – felhasználásával képes azonosítani. A szakember képes módosítani is ezeket oly módon, hogy e nukleinsav molekulák, gének, fehérjék vagy polipeptidek rekombináns mikroorganizmusban kifejeződjenek vagy termelődjenek (például megfelelő promóterek, riboszóma kötő-helyek, expressziós vagy integrációs vektorok felhasználásával, a gének szekvenciájának oly módon történő módosításával, hogy fokozódjon a transzkripció (figyelembe véve a preferálható kódon használatot), az itt leírt és a szakmában ismert technikák segítségével).

Egy megvalósítási formában a találmány szerinti gének Gram-pozitív mikroorganizmusból származnak (azaz olyan mikroorganizmusból, amely megtartja a bázikus színezéket, például kristályibolyát a mikroorganizmust körülvevő Gram-pozitív sejtfalnak köszönhetően). A „származás” (például Gram-pozitív mikroorganizmusból „származó”) olyan génre utal, amely természetes körülmények között megtalálható a mikroorganizmusban (például természe-

tes körülmények között megtalálható Gram-pozitív mikroorganizmusban). Előnyben részesített megvalósításban a találmány szerinti gének a *Bacillus*, *Corynebacterium* (*Corynebacterium glutamicum*), *Lactobacillus*, *Lactococcus* és *Streptomyces* nemzetségeket tartalmazó csoportból választott mikroorganizmusokból származnak. Még inkább előnyben részesített megvalósításban a találmány szerinti gének a *Bacillus* nemzetségbe tartozó mikroorganizmusból származnak. Egy másik előnyben részesített megvalósításban a találmány szerinti gének a *Bacillus subtilis*, *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus pantothenicus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus halodurans* és egyéb, 1. csoportba tartozó, például 16S rRNS típussal jellemezhető *Bacillus* fajok. Egy másik előnyben részesített megvalósítási formában a gén *Bacillus brevis*-ből vagy *Bacillus stearothermophilus*-ból származik. Egy másik előnyben részesített megvalósítási formában a találmány szerinti gének a *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* és *Bacillus pumilus* fajokat tartalmazó csoportból választott mikroorganizmusból származnak. Különösen előnyben részesített megvalósítási formában a gén *Bacillus subtilis*-ből származik (azaz *Bacillus subtilis*-származék). A „*Bacillus subtilis*-ből származó” vagy „*Bacillus subtilis*-származék” kifejezések olyan génre utalnak, amely természetes körülmények között megtalálható a *Bacillus subtilis* mikroorganizmusban. A találmány oltalmi körébe tartoznak *Bacillus*-

származék gének (például *B. subtilis*-származék gének), például *Bacillus* vagy *B. subtilis* *coaX* gének, *serA* gének, *glyA* gének, *coaA* gének, *pan* gének és/vagy *ilv* gének.

Egy másik megvalósítási formában a találmány szerinti gének Gram-negatív mikroorganizmusokból (bázikus színezéket kizáró mikroorganizmusokból) származnak. Előnyben részesített megvalósítási formában a találmány szerinti gének a *Salmonella* (például *Salmonella typhimurium*), *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia* és *Proteus* nemzetségeket tartalmazó csoportból választott mikroorganizmusokból származnak. Még inkább előnyben részesített megvalósítási formában a találmány szerinti gének az *Escherichia* nemzetségbe tartozó mikroorganizmusból származnak. Még ennél is inkább előnyben részesített megvalósítási formában a találmány szerinti gének *Escherichia coli*-ből származnak. Egy másik megvalósítási formában a találmány szerinti gének a *Saccharomyces* nemzetségből (például *Saccharomyces cerevisiae*-ből) származnak.

II. Rekombináns nukleinsav molekulák és vektorok

A találmány további tárgyát képezik olyan rekombináns nukleinsav molekulák (például rekombináns DNS molekulák), amelyek tartalmazzák az itt leírt géneket (például izolált géneket), előnyösen *Bacillus* géneket, még előnyösebben *Bacillus subtilis* géneket, még ennél is előnyösebben *Bacillus subtilis* pantotenát bioszintetikus géneket és/vagy izoleucin-valin (*ilv*) bioszintetikus géneket és/vagy metilén-tetrahidrofolát (MTF) bioszintetikus géneket. A „rekombináns nukleinsav molekula” kifejezés oly módon megváltoztatott, módosított vagy genetikailag átalakított nukleinsav molekulára (például DNS molekulára) utal, amelynek

nukleotid-szekvenciája eltér (például egy vagy több nukleotid addíciójával, deléciójával vagy szubsztitúciójával) a natív vagy természetben előforduló azon nukleinsav molekulától, amelyből a rekombináns nukleinsav molekula származik. A rekombináns nukleinsav molekula (például rekombináns DNS molekula) előnyösen szabályozó szekvenciákkal működőképesen összekapcsolt találmány szerinti izolált gént tartalmaz. A „szabályozó szekvenciákkal működőképesen összekapcsolt” kifejezés azt jelenti, hogy a szóban forgó gén nukleotid-szekvenciája oly módon kapcsolódik szabályozó szekvenciával vagy szekvenciákkal, hogy lehetővé válik a gén kifejeződése (például fokozott, megnövekedett, konstitutív, minimális, legyengített, csökkent vagy represszált kifejeződése), előnyösen a gén által kódolt termék kifejeződése (például ha a rekombináns nukleinsav molekula az itt leírtak szerint rekombináns vektorban van és azt bevezetjük egy mikroorganizmusba).

A „szabályozó szekvencia” kifejezés olyan nukleinsav-szekvenciát jelent, amely más nukleinsav-szekvenciák (például gének) kifejeződését befolyásolja (például módosítja vagy szabályozza). Egy megvalósítási formában a szabályozó szekvencia hasonló vagy azonos pozícióban és/vagy orientációban helyezkedik el a rekombináns nukleinsav molekulában, mint a szóban forgó gén, megfigyelve a szabályozó szekvenciát és a szóban forgó gént, elhelyezkedésük (például natív pozícióban és/vagy orientációban) természetesnek tűnik. Például a szóban forgó gént a rekombináns nukleinsav molekula tartalmazhatja működőképesen összekapcsolva olyan szabályozó szekvenciával, amely a természetes szervezetben

a szóban forgó génhez tartozik vagy szomszédos azzal (például működőképesen hozzákapcsolva natív szabályozó szekvenciákhoz, például natív promóterhez). Másik lehetőségként, a szóban forgó gént a rekombináns nukleinsav molekula tartalmazhatja működőképesen összekapcsolva olyan szabályozó szekvenciával, amely a természetes szervezetben egy másik (például eltérő) génhez tartozik vagy szomszédos azzal. Másik lehetőségként, a szóban forgó gént a rekombináns nukleinsav molekula tartalmazhatja működőképesen összekapcsolva egy másik szervezetből származó szabályozó szekvenciával. Például más mikrobákból származó szabályozó szekvenciák (például más bakteriális szabályozó szekvenciák, bakteriofág szabályozó szekvenciák és hasonló) kapcsolódhatnak működőképesen a szóban forgó génhez.

Egy megvalósítási formában a szabályozó szekvencia nem-natív vagy a természetben nem előforduló szekvencia (például módosított, mutáns, szubsztituált, származtatott, deletált szekvencia, beleértve kémiaiilag szintetizált szekvenciákat). Előnyben részesített szabályozó szekvenciák közé tartoznak promóterek, fokozók (enhancers), terminációs szignálok, anti-terminációs szignálok és egyéb expressziós kontroll elemek (például olyan szekvenciák, amelyekhez represszorok vagy inducerek kapcsolódnak és/vagy transzkripció és/vagy transzláció szabályozó fehérjék kötő helyei, például az átírt mRNS-ben). Ilyen szabályozó szekvenciákat írnak le például Sambrook és munkatársai [Sambrook, J., Fritsh, E.F. and Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1989)]. Szabályozó szekvenciák közé tartoz-

nak mikroorganizmusban nukleotid-szekvencia konstitutív kifejeződését irányító szekvenciák (például konstitutív promóterek és erős konstitutív promóterek), azok a szekvenciák, amelyek mikroorganizmusban nukleotid-szekvencia indukálható kifejeződését irányítják (például indukálható promóterek, például xilóz indukálható promóterek) és azok a szekvenciák, amelyek mikroorganizmusban nukleotid-szekvencia kifejeződését gyengítik (attenuate) vagy represszálják (például attenuációs szignálok vagy represzor szekvenciák). Szintén a találmány oltalmi körébe tartozik a szóban forgó gén kifejeződésének szabályozása szabályozó szekvenciák eltávolításával vagy deléciójával. Például a transzkripció negatív szabályozásában részt vevő szekvenciák eltávolításával a szóban forgó gén kifejeződése fokozható.

Egy megvalósítási formában a találmány szerinti rekombináns nukleinsav molekula legalább egy bakteriális génterméket (például pantotenát bioszintetikus enzimet, izoleucin-valin bioszintetikus enzimet és/vagy metilén-tetrahidrofolát (MTF) bioszintetikus enzimet) kódoló nukleinsav-szekvenciát vagy gént tartalmaz működőképesen hozzákapcsolva promóterhez vagy promóter szekvenciához. Előnyben részesített találmány szerinti promóterek közé tartoznak *Bacillus* promóterek és/vagy bakteriofág promóterek (például *Bacillus* fajokat fertőzni képes bakteriofág promótere). Egy megvalósítási formában a promóter *Bacillus* promóter, előnyösen erős *Bacillus* promóter (például a *Bacillus* biokémiai housekeeping génjéhez kapcsolódó promóter vagy a *Bacillus* glikolitikus útvonalának génjéhez kapcsolódó promóter). Egy másik megvalósítási formában a promóter bakteriofág promóter.

Előnyben részesített megvalósítási formában a promóter az SP01 bakteriofág promótere. Különösen előnyben részesített megvalósítási formában a promótert a P_{15} , P_{26} vagy P_{veg} promótereket tartalmazó csoportból választjuk, melyeknek szekvenciája rendre a következő:

GCTATTGACGACAGCTATGGTTCACCTGTCCACCAACCAAACTGTGCTCAGT
ACCGCCAATATTTCTCCCTTGAGGGGTACAAAGAGGTGTCCCTAGAAGAGAT
CCACGCTGTGTAAAAATTTTACAAAAAGGTATTGACTTTCCCTACAGGGTGT
GTAATAATTTAATTACAGGCGGGGGCAACCCCGCCTGT (1. számú szekvencia),
GCCTACCTAGCTTCCAAGAAAGATATCCTAACAGCACAAGAGCGGAAAGAT
GTTTTGTTCTACATCCAGAACAACCTCTGCTAAAATTCCTGAAAAATTTTGCA
AAAAGTTGTTGACTTTATCTACAAGGTGTGGTATAATAATCTTAACAACAGC

AGGACGC (2. számú szekvencia) és

GAGGAATCATAGAATTTTGTCAAATAATTTTATTGACAACGTCTTATTAAC
GTTGATATAATTTAAATTTTATTTGACAAAAATGGGCTCGTGTTGTACAATA

AATGTAGTGAGGTGGATGCAATG (3. számú szekvencia). További előnyben részesített promóterek közé tartoznak a *tef* (a transzlációs elongációs faktor (TEF) promóter) és *pyc* (a piruvát karboxiláz (PYC) promóter), amelyek elősegítik a magas szintű kifejeződést *Bacillus*-ban (például *Bacillus subtilis*-ben). További előnyben részesített – korlátozást azonban nem jelentő – promóterek Gram-pozitív baktériumokban történő felhasználáshoz az *amy* és SP02 promóterek. További előnyben részesített – korlátozást azonban nem jelentő – promóterek például Gram-negatív mikroorganizmusokban történő alkalmazáshoz a *cos*, *tac*, *trp*, *tet*, *trp-tet*, *lpp*, *lac*, *lpp-lac*, *lacIQ*, T7, T5, T3, *gal*, *trc*, *ara*, SP6, λ -PR vagy λ -PL.

Egy másik megvalósítási formában a találmány szerinti rekombináns nukleinsav molekula terminátor szekvenciát vagy terminátor szekvenciákat (például transzkripciós terminátor szekvenciákat) tartalmaz. A „terminátor szekvencia” kifejezés olyan szabályozó szekvenciát jelöl, amely mRNS transzkripciójának lezárását (terminációját) szolgálja. Terminátor szekvenciák (vagy tandem transzkripciós terminátorok) szolgálhatják még a mRNS stabilizálását (például mRNS-hez struktúra hozzáadásával), például nukleázokkal szemben.

Egy másik megvalósítási formában a találmány szerinti rekombináns nukleinsav molekula olyan szekvenciákat tartalmaz, amelyek lehetővé teszik nevezett szekvenciákat (azaz kimutatható és/vagy szelekciós markereket) tartalmazó vektor kimutatását, például antibiotikum rezisztenciát kódoló géneket vagy auxotróf mutációkat komplementálni képes géneket, például *trpC*-t, drog markereket, fluoreszcens markereket és/vagy kolorimetriás markereket (például *lacZ*/ β -galaktozidázt). Egy még további megvalósítási formában a találmány szerinti rekombináns nukleinsav molekula mesterséges riboszóma-kötő helyet (ribosome binding site = RBS) vagy mesterséges RBS-be átíródozó szekvenciát tartalmaz. A „mesterséges riboszóma-kötő hely” (RBS) kifejezés olyan helyet jelöl egy mRNS (például DNS-en kódolt) molekulán belül, amelyhez riboszóma kötődik (például a transzláció elindítására) és amely legalább egy nukleotidban eltér a natív RBS-től (például természetben előforduló génben található RBS-től). Előnyben részesített RBS-ek körülbelül 5-6, 7-8, 9-10, 11-12, 13-14, 15-16, 17-18, 19-20, 21-22, 23-24, 25-26, 27-28, 29-30 vagy több nukleo-

tídből állnak, amelyek közül körülbelül 1-2, 3-4, 5-6, 7-8, 9-10, 11-12, 13-15 vagy több eltér a natív RBS-től (például a szóban forgó gén natív RBS-étől, például a natív *panB* RBS-től, melynek szekvenciája: TAAACATGAGGAGGAGAAAACATG (4. számú szekvencia) vagy a natív *panD* RBS-től, melynek szekvenciája: ATTCGA GAAATGGAGAGAATATAATATG (5. számú szekvencia)). Az eltérő nukleotidok előnyösen oly módon szubsztituáltak, hogy azonosak legyenek egy ideális RBS egy vagy több nukleotidjával optimális összehasonlító sorbaállításnál. Ideális RBS-ek közé tartoznak – korlátozást azonban nem jelentenek – a következők:

AGAAAGGAGGTGA (6. számú szekvencia),

TTAAGAAAGGAGGTGANNNNNATG (7. számú szekvencia),

TTAGAAAGGAGGTGANNNNNATG (8. számú szekvencia),

AGAAAGGAGGTGANNNNNNNATG (9. számú szekvencia) és

AGAAAGGAGGTGANNNNNNNATG (10. számú szekvencia). Mesterséges RBS-ek felhasználhatók az egyes génekhez kapcsolódó, természetben előforduló vagy natív RBS-ek helyettesítésére. Előnyben részesített mesterséges RBS-ek (például *panB*, különösen *B. subtilis* *panB* transzlációját növelő RBS-ek) közé tartozik:

CCCTCTAGAAGGAGGAGAAAACATG (11. számú szekvencia) és

CCCTCTAGAGGAGGAGAAAACATG (12. számú szekvencia). Előnyben részesített mesterséges RBS-ek (például *panD*, különösen *B. subtilis* *panD* transzlációját növelő RBS-ek) közé tartozik:

TTAGAAAGGAGGATTTAAATATG (13. számú szekvencia),

TTAGAAAGGAGGTTTAATTAATG (14. számú szekvencia),

TTAGAAAGGAGGTGATTTAAATG (15. számú szekvencia),

TTAGAAAGGAGGTGTTTAAAATG (16. számú szekvencia),

ATTCGAGAAAGGAGGTGAATATAATATG (17. számú szekvencia),
ATTCGAGAAAGGAGGTGAATAATAATG (18. számú szekvencia) és
ATTCGTAGAAAGGAGGTGAATTAATATG (19. számú szekvencia).

A találmány tárgyát képezik továbbá nukleinsav molekulákat (például géneket vagy nevezett géneket tartalmazó rekombináns nukleinsav molekulákat) tartalmazó vektorok (például rekombináns vektorok) az itt leírtak szerint. A „rekombináns vektor” kifejezés olyan vektorra (például plazmid, fág, fazmid, vírus, kozmid vagy egyéb tisztított nukleinsav vektorra) utal, amely oly módon megváltoztatott, módosított vagy genetikailag átalakított, hogy több, kevesebb vagy eltérő nukleinsav-szekvenciával rendelkezik, mint az a natív vagy természetben előforduló nukleinsav molekula, amelyből a rekombináns vektor származik. A rekombináns vektor előnyösen bioszintetikus enzimet kódoló gént vagy nevezett gént hordozó rekombináns nukleinsav molekulát tartalmaz működőképesen hozzákapcsolva szabályozó szekvenciákhoz, például promóter szekvenciákhoz, terminátor szekvenciákhoz és/vagy mesterséges riboszóma-kötő helyekhez (RBS-ekhez) az itt leírtak szerint. Egy másik megvalósítási formában a találmány szerinti rekombináns vektor tartalmaz olyan szekvenciákat, amelyek fokozzák a replikációt baktériumokban (például replikációt fokozó szekvenciákat). Egy megvalósítási formában a replikációt fokozó szekvenciák *E. coli*-ban működőképesek. Egy másik megvalósítási formában a replikációt fokozó szekvenciák pBR322 plazmidból származnak.

Egy még további megvalósítási formában a találmány szerinti rekombináns vektor antibiotikum rezisztencia szekvenciákat tar-

talmaz. Az „antibiotikum rezisztencia szekvencia” olyan szekvenciát jelöl, amely elősegíti vagy átadja az adott antibiotikummal szembeni érzéketlenséget (rezisztenciát) a gazdaszervezetnek (például *Bacillus*-nak). Egy megvalósítási formában az antibiotikum rezisztencia szekvenciákat a következőket tartalmazó csoportból választjuk: *cat* (klóramfenikol rezisztencia) szekvencia, *tet* (tetraciklin rezisztencia) szekvencia, *erm* (eritromicin rezisztencia) szekvencia, *neo* (neomicin rezisztencia) szekvencia, *kan* (kanamicin rezisztencia) szekvencia és *spec* (spectinomycin rezisztencia) szekvencia. A találmány szerinti rekombináns vektorok tartalmazhatnak továbbá homológ rekombinációs szekvenciákat (például a szóban forgó génnek a gazdaszervezet kromoszómájába történő rekombinációja lehetővé tételére). Például *bpr*, *vpr* vagy *amyE* szekvenciák alkalmazhatók, mint homológia célpontok a gazdaszervezet kromoszómájába történő rekombinációhoz. A szakember számára nyilvánvaló, hogy a vektor megtervezése olyan faktorok függvénye, mint a genetikailag módosítandó mikroorganizmus kiválasztása, a kívánt géntermék kifejeződési szintjének megválasztása és hasonlók.

IV. Rekombináns mikroorganizmusok

A találmány tárgyát képezik továbbá az itt leírt vektorokat vagy géneket (például vad típusú vagy mutáns géneket) tartalmazó mikroorganizmusok, azaz rekombináns mikroorganizmusok. Az itt leírtak szerint a „rekombináns mikroorganizmus” kifejezés olyan genetikailag megváltoztatott, módosított vagy manipulált (például genetikailag átalakított) mikroorganizmust (például baktériumot, élesztőt, gombát, stb.) jelent, amely ahhoz a természetben

előforduló mikroorganizmushoz képest, amelyikből származik, megváltozott, módosított vagy eltérő genotípust és/vagy fenotípust mutat (például ha a genetikai módosítás érinti a mikroorganizmus kódoló nukleinsav-szekvenciáit).

Egy megvalósítási formában a találmány szerinti rekombináns mikroorganizmus Gram-pozitív szervezet (azaz olyan mikroorganizmus, amely megtartja a bázikus színezéket, például kristályibolyát a mikroorganizmust körülvevő Gram-pozitív sejtfalnak köszönhetően). Előnyben részesített megvalósításban a találmány szerinti rekombináns mikroorganizmus a *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* és *Streptomyces* nemzetségeket tartalmazó csoportból választott mikroorganizmus. Még inkább előnyben részesített megvalósításban a találmány szerinti rekombináns mikroorganizmus a *Bacillus* nemzetségbe tartozó mikroorganizmus. Egy másik előnyben részesített megvalósításban a találmány szerinti rekombináns mikroorganizmust a *Bacillus subtilis*, *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus pantothenicus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus halodurans* és egyéb, 1. csoportba tartozó, például 16S rRNS típussal jellemezhető *Bacillus* fajokat tartalmazó csoportból választjuk. Egy másik előnyben részesített megvalósítási formában a rekombináns mikroorganizmus *Bacillus brevis* vagy *Bacillus stearothermophilus*. Egy másik előnyben részesített megvalósítási formában a találmány szerinti rekombináns mikroorganizmus a *Bacillus licheniformis*, *Bacillus*

amyloliquefaciens, *Bacillus subtilis* és *Bacillus pumilus* fajokat tartalmazó csoportból választott mikroorganizmus.

Egy másik megvalósítási formában a találmány szerinti rekombináns mikroorganizmus Gram-negatív mikroorganizmus (bázikus színezéket kizáró mikroorganizmusokból). Előnyben részesített megvalósítási formában a találmány szerinti rekombináns mikroorganizmus a *Salmonella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia* és *Proteus* nemzetségeket tartalmazó csoportból választott mikroorganizmus. Még inkább előnyben részesített megvalósítási formában a találmány szerinti rekombináns mikroorganizmus az *Escherichia* nemzetségbe tartozó mikroorganizmus. Még ennél is inkább előnyben részesített megvalósítási formában a találmány szerinti rekombináns mikroorganizmus *Escherichia coli*. Egy másik megvalósítási formában a találmány szerinti rekombináns mikroorganizmus *Saccharomyces* (például *Saccharomyces cerevisiae*).

A találmány szerint előnyben részesített „rekombináns” mikroorganizmus deregulált pantotenát bioszintézis útvonallal vagy enzimmal, deregulált izoleucin-valin (ilv) bioszintézis útvonallal vagy enzimmal és/vagy módosított vagy deregulált metiléntetrahydrofolát (MTF) bioszintézis útvonallal vagy enzimmal rendelkező mikroorganizmus. A „deregulált” vagy „dereguláció” kifejezés egy mikroorganizmus legalább egy - bioszintetikus enzimet kódoló - génjének oly módon történő megváltoztatását vagy módosítását jelenti, hogy a bioszintetikus enzim szintje vagy aktivitása a mikroorganizmusban megváltozik vagy módosul. Előnyösen legalább egy - bioszintetikus enzimet kódoló - gén változik meg vagy módosul oly módon, hogy a géntermék fokozódik vagy megnő. A

„deregulált bioszintézis útvonal” kifejezés olyan bioszintézis útvonalat is jelenthet, amelyben egynél több – bioszintetikus enzimet kódoló – gén változik meg vagy módosul oly módon, hogy egynél több bioszintetikus enzim szintje vagy aktivitása változik meg vagy módosul. Egy bioszintézis útvonal „deregulálásának” (például adott bioszintézis útvonalon egynél több gén egyidejű deregulációjának) képessége egy mikroorganizmusban néhány esetben az adott mikroorganizmus fenoménjéből ered, amennyiben egynél több enzimet (például két vagy három bioszintetikus enzimet) a genetikai anyag egy összefüggő darabján egymással szomszédosan elhelyezkedő gének – melyeket „operon”-nak nevezünk (korábban definiáltuk) – kódolnak. Egy operonban foglalt gének egymással összehangolt szabályozásának köszönhetően az egyedüli promóter és/vagy szabályozó elem megváltoztatása vagy módosítása az operon által kódolt minden egyes géntermék megváltozott vagy módosult kifejeződését eredményezheti. A szabályozó elem megváltoztatása vagy módosítása – korlátozás nélkül – jelentheti az endogén promóter és/vagy szabályozó elem(ek) eltávolítását, erős promóterek, indukálható promóterek vagy összetett promóterek hozzáadását vagy szabályozó szekvenciák oly módon történő eltávolítását, hogy a géntermék kifejeződése megváltozzon, az operon kromoszómális elhelyezkedésének módosítását, az operonnal szomszédos vagy az operonon belüli nukleinsav-szekvenciák, úgymint riboszóma-kötő hely megváltoztatását, az operon példányszámának növelését, az operon transzkripciójában és/vagy az operon géntermékeinek transzlációjában részt vevő fehérjék (például szabályozó fehérjék, szupresszorok, fokozók, transzkripciós akti-

vátorok és hasonló) módosítását vagy gének kifejeződésének bármilyen, a szakmában rutinszerűen alkalmazott egyéb hagyományos eszközzel történő deregulációját (beleértve - korlátozást azonban nem jelentve - antiszenz nukleinsav molekulák felhasználását, például represszor fehérjék kifejeződésének blokkolására). A dereguláció magába foglalhatja egy vagy több gén kódoló régiójának megváltoztatását is, például feedback rezisztens, vagy nagyobb vagy alacsonyabb specifikus aktivitású enzim kinyerése érdekében.

Egy másik előnyben részesített megvalósításban a rekombináns mikroorganizmust úgy tervezzük meg és alakítjuk ki, hogy legalább egy pantotenát bioszintetikus enzim, legalább egy izoleucin-valin bioszintetikus enzim és/vagy legalább egy metiléntetrahidrofolát (MTF) bioszintetikus enzim túlzottan kifejeződjön. A „túlzott kifejeződés” azt jelenti, hogy a géntermék (például bioszintetikus enzim) magasabb szinten fejeződik ki, mint a mikroorganizmus genetikai átalakítása előtt vagy egy olyan összehasonlítható mikroorganizmusban, amelyet nem manipuláltunk. Egy megvalósítási formában a mikroorganizmus lehet genetikailag oly módon tervezett vagy átalakított, hogy a génterméket túlzottan kifejezze, magasabb szinten, mint ahogyan egy nem manipulált összehasonlítható mikroorganizmusban kifejeződik.

Genetikai átalakítás - korlátozást nem jelentve - magába foglalhatja, az adott gén kifejeződésével összefüggő szabályozó szekvenciák vagy helyek megváltoztatását vagy módosítását (például erős promóterek, indukálható promóterek vagy összetett promóterek hozzáadásával vagy szabályozó szekvenciák oly módon

történő eltávolításával, hogy a kifejeződés konstitutív legyen), az adott gén kromoszómális elhelyezkedésének módosítását, az adott génnel szomszédos nukleinsav-szekvenciák, úgymint riboszóma-kötő hely megváltoztatását, az adott gén példányszámának növelését, az adott gén transzkripciójában és/vagy az adott gén termékeinek transzlációjában részt vevő fehérjék (például szabályozó fehérjék, szupresszorok, fokozók, transzkripciós aktivátorok és hasonló) módosítását vagy egy adott gén kifejeződésének bármilyen, a szakmában rutinszerűen alkalmazott egyéb hagyományos eszközzel történő deregulációját (beleértve - korlátozást azonban nem jelentve - antiszenz nukleinsav molekulák felhasználását, például represszor fehérjék kifejeződésének blokkolására). Genetikai módosításba beletartozhat gén deléciója is, például bioszintézis útvonal blokkolása vagy represszor eltávolítása céljából.

Egy másik megvalósítási formában a mikroorganizmus lehet fizikailag vagy környezetileg manipulált, hogy a génterméket túlzottan kifejezze, magasabb szinten, mint ahogyan egy nem manipulált összehasonlítható mikroorganizmusban kifejeződik. Például a mikroorganizmus kezelhető az adott gén transzkripcióját és/vagy az adott gén termékének transzlációját tudottan vagy sejtetően növelő vegyszerrel, vagy tenyészthető annak jelenlétében oly módon, hogy a transzkripció és/vagy transzláció fokozódik vagy növekszik. Másik lehetőségként a mikroorganizmus tenyészthető az adott gén transzkripciójának és/vagy az adott gén terméke transzlációjának növelésére kiválasztott hőmérsékleten oly módon, hogy a transzkripció és/vagy transzláció fokozódik vagy nö-

vekszik.

V. Rekombináns mikroorganizmusok tenyésztése és fermentálása

A „tenyésztés” kifejezés a találmány szerinti élő mikroorganizmus fenntartását és/vagy szaporítását (például egy kultúra vagy törzs fenntartását és/vagy szaporítását) jelenti. Egy megvalósítási formában a találmány szerinti mikroorganizmust folyékony tápközegben tenyésztjük. Egy másik megvalósítási formában a találmány szerinti mikroorganizmust szilárd tápközegben vagy félig szilárd tápközegben tenyésztjük. Előnyben részesített megvalósításban a találmány szerinti mikroorganizmust a mikroorganizmus fenntartásához és/vagy szaporításához nélkülözhetetlen vagy kedvező hatású tápanyagokat (például szénforrást vagy széntartalmú szubsztrátot, úgymint például szénhidrátot, szénhidrogéneket, olajokat, zsírokat, zsírsavakat, szerves savakat és alkoholokat; nitrogén forrást, úgymint például peptont, élesztőkivonatot, húskivonatot, maláta-kivonatot, szójakorpát, szójalisztet, szójadarát, karbamidot, ammónium-szulfátot, ammónium-kloridot, ammónium-nitrátot és ammónium-foszfátot; foszfor forrást, úgymint például foszforsavat, ennek nátrium és kálium sóját; nyomelemeket, úgymint magnéziumot, vasat, mangánt, kalciumot, rézet, cinket, bórt, molibdént és/vagy kobaltot tartalmazó sókat ugyanúgy, mint növekedési faktorokat, úgymint aminosavakat, vitaminokat növekedést fokozókat és hasonlókat) tartalmazó tápközegben (például steril, folyékony tápközegben) tenyésztjük.

A találmány szerinti mikroorganizmusokat előnyösen ellenőrzött pH mellett tenyésztjük. Az „ellenőrzött pH” olyan pH értéket jelent, amely a kívánt termék (például pantoát és/vagy pan-

totenát) termelődését eredményezi. Egy megvalósítási formában a mikroorganizmust körülbelül 7 pH értéken tenyésztjük. Egy másik megvalósítási formában a mikroorganizmust 6,0 és 8,5 pH közötti értéken tenyésztjük. A kívánt pH érték a szakmában ismert számos módszer bármelyikével fenntartható.

Előnyben részesített megvalósítási formában a találmány szerinti mikroorganizmusokat ellenőrzött levegőztetés mellett tenyésztjük. Az „ellenőrzött levegőztetés” a kívánt termék (például pantoát és/vagy pantotenát) előállításához elegendő mértékű levegőztetést (azaz oxigén ellátást) jelent. Egy megvalósítási formában a levegőztetést a tenyészetben az oxigén szint szabályozásával kontrolláljuk, például a tápközeg oldott oxigén tartalmának szabályozásával. A levegőztetés kontrollját a tápközegben előnyösen a tenyészet keverésével biztosítjuk. A keverés megoldható propellerrel vagy hasonló mechanikai keverő berendezéssel, a tenyésztő edény (például kémcső vagy lombik) forgatásával vagy rázásával vagy különböző pumpáló berendezéssel. A levegőztetés biztosítható továbbá steril levegő vagy oxigén átáramoltatásával a tápközegen (például a fermentációs keveréken keresztül). A találmány szerinti mikroorganizmusokat előnyösen főlegesen habzás nélkül (például habzásgátló adagolása mellett) tenyésztjük.

A találmány szerinti mikroorganizmusokat tenyésztethetjük továbbá ellenőrzött hőmérsékleten. Az „ellenőrzött hőmérséklet” a kívánt termék (például pantoát és/vagy pantotenát) előállítását eredményező bármilyen hőmérsékletet felölel. Egy megvalósítási formában az ellenőrzött hőmérséklet tartománya 15 °C és 95 °C kö-

zötti. Egy másik megvalósítási formában az ellenőrzött hőmérséklet 15°C és 70°C között van. Előnyben részesített hőmérsékletek a 20°C és 55°C közötti, még előnyösebben a 30°C és 50°C közötti hőmérsékletek.

Mikroorganizmusok tenyésztethetők (például fenntarthatók és/vagy szaporíthatók) folyékony tápközegekben, és előnyösen vagy folyamatosan vagy szakaszosan tenyésztjük azokat hagyományos tenyésztési eljárásokkal, úgymint állandó tenyészetben, kémcső kultúrában, rázatott kultúrában (például körkörösén rázatott kultúrában, rázatott lombikos tenyészetben, stb.) levegőztetett pörgetett kultúrában vagy fermentációban. Előnyben részesített megvalósításban a mikroorganizmusokat rázatott lombikokban tenyésztjük. Még előnyösebb megvalósításban a mikroorganizmusokat fermentorban (például fermentációs eljárással) tenyésztjük. A találmány szerinti fermentációs eljárások közé tartoznak – korlátozást azonban nem jelentenek – a batch, fed-batch és folytonos fermentációs eljárások vagy módszerek. A „batch eljárás” vagy „batch fermentáció” elnevezés olyan rendszerre utal, amelynél a tápközeg összetevőit, tápanyagokat, tápanyag kiegészítőket és hasonlókat a fermentáció kezdetekor állítjuk össze és nem eszközölünk változtatást a fermentáció során, kivéve az olyan faktorokat, mint a pH vagy oxigén koncentráció, amelyek kontrolljára szükség van a tápközeg elsavasodásának és/vagy a mikroorganizmusok pusztulásának elkerülése érdekében. A „fed-batch eljárás” vagy „fed-batch fermentáció” elnevezés szakaszos fermentációra utal, azzal a kivétellel, hogy egy vagy több szubsztrátot vagy kiegészítőt a fermentációs folyamat előrehaladtával

adagolunk (például növekvő adagokban vagy folyamatosan). A „folytonos eljárás” vagy „folytonos fermentáció” elnevezés olyan rendszerre utal, amelynél definiált fermentációs tápközeget adagolunk folyamatosan a fermentorba és egyidejűleg ugyanolyan mennyiségű, használt vagy „kondicionált” tápközeget távolítunk el a fermentorból, előnyösen a kívánt termék (például pantoát és/vagy pantotenát) kinyerésével. Ilyen eljárások különböző változatait fejlesztették ki és ezek jól ismertek a szakmában.

A „tenyésztés olyan körülmények között, hogy a kívánt vegyület termelődjön” kifejezés magába foglalja a mikroorganizmus fenntartását és/vagy szaporítását a kívánt vegyület termeléséhez vagy az adott termék kívánt hozamának eléréséhez megfelelő vagy elégséges körülmények között. Például a tenyésztést a vegyület (például pantoát vagy pantotenát) kívánt mennyiségének termeléséhez elegendő ideig folytatjuk. A tenyésztést előnyösen annyi ideig folytatjuk, amennyi elegendő a vegyület megfelelő feldúsulásához (például elegendő ideig ahhoz, hogy elérjük a pantoát és/vagy pantotenát megfelelő termelődését vagy a pantoát és/vagy pantotenát : HMBPA megfelelő arányát). Egy megvalósítási formában a tenyésztést körülbelül 12-24 órán keresztül végezzük. Egy másik megvalósítási formában a tenyésztést körülbelül 24-36 órán át, 36-48 órán át, 48-72 órán át, 72-96 órán át, 96-120 órán át, 120-144 órán át vagy még tovább folytatjuk. Egy további megvalósítási formában a mikroorganizmusokat olyan körülmények között tenyésztjük, hogy körülbelül 36 óra alatt legalább körülbelül 5-10 g/l termék, körülbelül 48 óra alatt legalább körülbelül 10-20 g/l termék és körülbelül 72 óra alatt legalább körülbelül 20-30

g/l termék képződjön. Egy még további megvalósítási formában a mikroorganizmusokat olyan körülmények között tenyésztjük, hogy körülbelül 36 óra alatt legalább körülbelül 5-20 g/l termék, körülbelül 48 óra alatt legalább körülbelül 20-30 g/l termék vagy körülbelül 72 óra alatt legalább körülbelül 30-50 g/l vagy 60 g/l termék képződjön. Egy még további megvalósítási formában a mikroorganizmusokat olyan körülmények között tenyésztjük, hogy körülbelül 36 óra alatt legalább körülbelül 40-60 g/l termék vagy körülbelül 48 óra alatt legalább körülbelül 60-90 g/l termék képződjön. A szakember fel tudja becsülni, hogy az itt bemutatott koncentráció tartományok felső limitje fölötti értékek elérhetők az itt leírt eljárásokkal, például speciális fermentáció futtatásával vagy különleges, manipulált törzs segítségével.

A találmány szerinti előállítási módszer előnyösen „megfelelő kontrollal összehasonlítva fokozott” pantotenát termelési szintet eredményez. A „megfelelő kontroll” kifejezésbe az itt leírtak szerint a szakember által ismert minden olyan kontrollt beleértünk, amely alkalmas a kívánt termék fokozott, megnövelt vagy megemelt szintjeinek meghatározására. Például, ahol a találmány tárgyát deregulált pantotenát bioszintézis útvonallal rendelkező mikroorganizmus tenyésztése képezi és nevezett mikroorganizmusnak továbbá MTF bioszintézis útvonala is deregulált (azaz genetikailag oly módon átalakított, hogy legalább egy MTF bioszintetikus enzimje deregulált, például túlzottan kifejezett), megfelelő kontroll a mikroorganizmus MTF enzimje vagy bioszintézis útvonala genetikai átalakítása előtti tenyésztete vagy olyan mikroorganizmus tenyésztet, amelyben nem történt meg az MTF

az MTF enzim vagy bioszintézis útvonal manipulációja (azaz csak a pantotenát bioszintézis útvonala deregulált). Ehhez hasonlóan, ahol a találmány tárgyát deregulált pantotenát bioszintézis útvonallal és deregulált *ilv* bioszintézis útvonallal rendelkező mikroorganizmus tenyésztése képezi és nevezett mikroorganizmusnak továbbá MTF bioszintézis útvonala is deregulált (azaz genetikailag oly módon átalakított, hogy legalább egy MTF bioszintetikus enzimje deregulált, például túlzottan kifejezett), megfelelő kontroll a mikroorganizmus MTF enzimje vagy bioszintézis útvonala genetikai átalakítása előtti tenyésztete vagy olyan mikroorganizmus tenyésztet, amelyben nem történt meg az MTF enzim vagy bioszintézis útvonal manipulációja (azaz csak a pantotenát bioszintézis útvonala és *ilv* bioszintézis útvonala deregulált). Nem szükséges minden egyes, a találmány szerint megvalósított eljárásnál összehasonlítást végezni. A szakember képes például reakció sorozatok (például kémcső tenyészetek, rázatott lombikos tenyészetek, fermentációk) elvégzéséből empirikusan megfelelő kontrollok meghatározására, például ugyanazon vagy hasonló körülmények között. Miután megbecsülte a rutinszerűen elérhető termelési szintet például egy speciális törzzsel, a szakember képes felismerni az ilyen szinthez képest fokozott, megnövekedett vagy megemelkedett szinteket. Más szavakkal, megfelelő kontrollal való összehasonlításba beletartozik egy előre meghatározott értékkel (például előre meghatározott kontrollal) történő összehasonlítás.

Ilyenformán tehát egy megvalósítási formában, ahol egy genetikailag megfelelően átalakított törzs 36 óra alatt 40 g/l pan-

totenátot termel (a pantotenát termelés fokozása céljából történő manipulálást megelőzően), 50 g/l, 60 g/l, 70 g/l vagy ennél több pantotenát képződése (manipulálást követően, például manipulálást oly módon, hogy legalább egy MTF bioszintetikus enzim túlzottan kifejeződik) fokozott termelődést példáz. Ehhez hasonlóan, egy megvalósítási formában, ahol egy genetikailag megfelelően átalakított törzs 48 óra alatt 50 g/l pantotenátot termel (a pantotenát termelés fokozása céljából történő manipulálást megelőzően), 60 g/l, 70 g/l, 80 g/l, 90 g/l vagy ennél több pantotenát képződése (manipulálást követően, például manipulálást oly módon, hogy legalább egy MTF bioszintetikus enzim túlzottan kifejeződik) fokozott termelődést példáz.

A találmány szerinti eljárás tartalmazhatja továbbá a kívánt termék (például pantoát vagy pantotenát) kinyerésének lépését. A kívánt termék „kinyerése” magába foglalja a vegyület extrakcióját, izolálását vagy tisztítását a tenyésztéshez használt tápközegből. A vegyület kinyerése történhet bármely, a szakmában ismert hagyományos izolálási vagy tisztítási módszer szerint, beleértve – korlátozást azonban nem jelentve – hagyományos gyantával (például anion- vagy kationcserélő, nem-ionos adszorpciós gyantával) való kezelést, hagyományos adszorbenssel (például aktivált faszénnel, kovással, szilikagéllal, cellulózzal, alumíniummal, stb.) történő kezelést, pH változtatást, oldószeres extrakciót (például szokásos oldószerrel, úgymint alkohollal, etilacetáttal, hexánnal és hasonlókkal), dialízist, szűrést, betöményítést, kristályosítást, újra kristályosítást, pH beállítást, liofilezést és hasonlókat. Például a vegyület kinyerhető a

tápközegből először a mikroorganizmus tápközegből való eltávolításával. A tápközeget ezután kationok eltávolítása céljából átvezetjük egy kationcserélő gyantán és azután egy anioncserélő gyantán a szóban forgó vegyületnél erősebb aciditású szerves és szervetlen anionok eltávolítása céljából. Az eredményül kapott vegyület ezután az itt leírtak szerint sóvá (például kalcium sóvá) alakítható.

A találmány szerinti kívánt vegyületet előnyösen oly módon „extraháljuk”, „izoláljuk” vagy „tisztítjuk”, hogy az eredményül kapott preparátum lényegében mentes az egyéb tápközeg komponensektől (például tápközeg összetevőktől és/vagy fermentációs melléktermékektől mentes). Az „egyéb tápközeg komponensektől mentes” megjelölés a kívánt vegyület olyan preparátumaira utal, amelyekben a vegyületet elválasztottuk annak a tenyészetnek a tápközeg összetevőitől vagy fermentációs melléktermékeitől, amelyben az termelődött. Egy megvalósítási formában a preparátum (száraz tömegre vonatkoztatva) több, mint körülbelül 80%-ban a kívánt vegyületet tartalmazza (például kevesebb, mint körülbelül 20%-ban tartalmaz egyéb tápközeg összetevőt vagy fermentációs mellékterméket), előnyösebben több, mint körülbelül 90%-ban tartalmazza a kívánt vegyületet (például kevesebb, mint körülbelül 10%-ban tartalmaz egyéb tápközeg összetevőt vagy fermentációs mellékterméket), még előnyösebben több, mint körülbelül 95%-ban tartalmazza a kívánt vegyületet (például kevesebb, mint körülbelül 5%-ban tartalmaz egyéb tápközeg összetevőt vagy fermentációs mellékterméket) és legelőnyösebben több, mint körülbelül 98-99%-ban a kívánt vegyületet tartalmazza (például kevesebb, mint kö-

rülbelül 1-2%-ban tartalmaz egyéb tápközeg összetevőt vagy fermentációs mellékterméket). Amennyiben a kívánt vegyületet sóvá alakítjuk, a vegyület előnyösen mentes továbbá a sóvá alakítással kapcsolatos kémiai szennyezőktől. Ha a kívánt vegyületet alkohollá alakítjuk, a vegyület előnyösen mentes továbbá az alkohollá alakítással kapcsolatos kémiai szennyezőktől.

Alternatív megvalósítási formában a kívánt vegyületet nem tisztítjuk meg a mikroorganizmustól, ha a mikroorganizmus biológiailag nem veszélyes (azaz ártalmatlan). Például a teljes tenyészet (vagy tenyészet felülúszó) felhasználható termék forrásként (például nyers termékként). Egy megvalósításban a tenyészetet (vagy tenyészet felülúszót) módosítás nélkül felhasználjuk. Egy másik megvalósításban a tenyészetet (vagy tenyészet felülúszót) szárítjuk vagy liofilizáljuk.

Egy még további megvalósításban a kívánt vegyület részlegesen tisztított. A „részlegesen tisztított” kifejezés olyan tápközeg preparátumokra utal, amelyek legalább néhány feldolgozási műveleten (például batch kezelésem), például kereskedelmi gyanúval történt kezelésem átestek. Előnyben részesített megvalósítási formákban a „részlegesen tisztított” preparátum szárazanyagra vonatkoztatva körülbelül 30%-nál nagyobb mennyiségben, előnyösen körülbelül 40%-nál nagyobb mennyiségben, előnyösebben körülbelül 50%-nál nagyobb mennyiségben, még előnyösebben körülbelül 60%-nál nagyobb mennyiségben és legelőnyösebben körülbelül 70%-nál nagyobb mennyiségben tartalmazza a kívánt vegyületet. „Részlegesen tisztított” preparátumok előnyösen tartalmazhatják a kívánt vegyületet szárazanyagra vonatkoztatva 80%-ban vagy en-

nél kisebb arányban is (azaz kevésbé tiszták, mint az itt leírtak szerinti „extrahált”, „izolált” vagy „tisztított” preparátumok).

A manipulált bioszintetikus enzimtől vagy bioszintetikus enzimek kombinációjától függően kívánatos vagy szükséges lehet a találmány szerinti mikroorganizmus számára legalább egy bioszintetikus prekursor biztosítása (például tápanyagként adagolva), hogy a kívánt vegyület vagy vegyületek termelődjenek. A „bioszintetikus prekursor” vagy „prekursor” olyan vegyszert vagy vegyületet jelent, amely a mikroorganizmussal érintkeztetve vagy a mikroorganizmus tápközegébe adagolva a kívánt termék bioszintézisének fokozását vagy növelését szolgálja. Egy megvalósítási formában a bioszintetikus prekursor vagy prekursor aszpartát. Egy másik megvalósítási formában a bioszintetikus prekursor vagy prekursor β -alanin. Az aszpartátot vagy β -alanint előnyösen olyan mennyiségben adagoljuk, amely a mikroorganizmus produktivitásának fokozásához elegendő koncentrációt (például pantoát és/vagy pantotenát termelődésének fokozásához elegendő koncentrációt) eredményez a tápközegben. A találmány szerinti bioszintetikus prekursorok adagolhatók koncentrált oldat vagy szuszpenzió formájában (például alkalmas oldószerben, úgymint vízben vagy pufferben) vagy szilárd formában (például por alakban). A találmány szerinti bioszintetikus prekursorok adagolhatók továbbá egy adagban, folyamatosan vagy egy adott időperiódus alatt szakaszonként. A „ β -alanin fölösleg” kifejezés olyan β -alanin szintre utal, amely a szóban forgó mikroorganizmus tenyésztéséhez szokásosan alkalmazott mennyiségnél nagyobb vagy megnövelt. Például a példákban leírt *Bacillus* mikroorganizmusok tenyésztése

dákban leírt *Bacillus* mikroorganizmusok tenyésztése szokásosan 0-0,01 g/l β -alanin jelenlétében történik. Ennek megfelelően a β -alanin fölösleg körülbelül 0,01-1 g/l szintet, előnyösen körülbelül 1-20 g/l szintet jelenthet.

Egy további megvalósítási formában a bioszintetikus prekursor valin. Egy még további megvalósítási formában a bioszintetikus prekursor α -keto-izovalerát. A valint vagy az α -keto-izovalerátot előnyösen olyan mennyiségben adagoljuk, amely a tápközegben elegendő koncentrációt eredményez ahhoz, hogy a kívánt termék (például pantoát és/vagy pantotenát) termelődjön. Az „ α -KIV fölösleg” a szóban forgó mikroorganizmus tenyésztéséhez szokásosan felhasznált α -KIV szinthez képest megnövelt vagy magasabb α -KIV szintet jelent. Például az itt következő példákban leírt *Bacillus* mikroorganizmus tenyésztése szokásosan körülbelül 0-0,01 g/l α -KIV jelenlétében történik. Ennek megfelelően az α -KIV fölösleg körülbelül 0,01-1 g/l, előnyösen körülbelül 1-20 g/l α -KIV szinteket jelent. A „valin fölösleg” a szóban forgó mikroorganizmus tenyésztéséhez szokásosan felhasznált valin szinthez képest megnövelt vagy magasabb valin szintet jelent. Például az itt következő példákban leírt *Bacillus* mikroorganizmus tenyésztése szokásosan körülbelül 0-0,5 g/l valin jelenlétében történik. Ennek megfelelően a valin fölösleg körülbelül 0,5-5 g/l, előnyösen körülbelül 5-20 g/l valin koncentrációkat jelenthet.

Egy még további megvalósítási formában a bioszintetikus prekursor szerin. Szerint előnyösen olyan mennyiségben adagoljuk, hogy a kívánt termék (például pantoát vagy pantotenát) kép-

zódéséhez elegendő koncentrációban legyen a tápközegeben. Szerin főlösleg (ahogyan itt definiáltuk) is adható az itt leirt eljárások szerint, például pantotenát fokozott termelése céljából. A szakember számára nyilvánvaló, hogy bioszintetikus prekursorok extrém főlöslege toxicitást eredményezhet a mikroorganizmusban. Bioszintetikus prekursorokra, mint „kiegészítő bioszintetikus szubsztrátokra” is utalunk itt.

A találmány tárgyát egy másik vonatkozásban az itt leirt rekombináns mikroorganizmusokat alkalmazó biotranszformációs eljárások képezik. A „biotranszformációs eljárás” kifejezés – amely helyett itt a „biokonverziós eljárás” kifejezést is használjuk – olyan biológiai eljárásokat (például transzformációt vagy konverziót) jelöl, amelyek megfelelő szubsztrátokból és/vagy köztes termékekből a kívánt termék termelődését eredményezik.

A biotranszformációs reakciókban felhasznált mikroorganizmus(ok) és/vagy enzimek olyan formában vannak, amely lehetővé teszi ezeknek a kitűzött feladat (funkció) elvégzését (például a kívánt termék előállítását). A mikroorganizmusok lehetnek egész sejtek vagy lehetnek a sejtek csupán azon részei, amelyek a kívánt eredmény eléréséhez szükségesek. A mikroorganizmusok rendelkezésre állhatnak szuszpendálva (például megfelelő oldatban, úgymint pufferolt oldatokban vagy tápközegekben), leöblítve (például a mikroorganizmus tenyésztő tápközegetől öblítéssel megszabadítva), acetonnal megszárítva, rögzítve (például poliakrilamid gélen vagy k-karragenumon vagy szintetikus hordozón, úgymint például gyöngyökön, mátrixokon és hasonlókon), fixálva, kereszt-kötéssel kapcsolva vagy permeabilizálva (például

félig áteresztő membránja és/vagy sejtfala van, ezért vegyületek, úgymint például szubsztrátok, köztes termékek vagy termékek sokkal könnyebben tudnak áthaladni nevezett membránon vagy sejtfalon).

~~A találmányt az alábbi példákkal szemléltetjük, amelyek azonban nem jelentik a találmány oltalmi körének korlátozását. Az itt hivatkozott referenciák, szabadalmak és szabadalmi bejelentések tartalmát teljes egészében beépítettük referenciaként.~~

Példák

I. példa: Panto-vegyületet termelő törzsek

Bacillus törzsek pantotenát termeléshez történő kifejlesztése során genetikai manipulációkat végeztünk a pantotenát bioszintézis útvonal és az izoleucin-valin (ilv) bioszintézis útvonal génjein és enzimjein (1. ábra), ~~09/400,494 és 09/667,569 sorozatszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésekben leírtak alapján.~~ Például deregulált *panBCD* operonnal és/vagy deregulált *panE1* génnel rendelkező törzsek - β -alanin és α -keto-izovalerát (α -KIV) jelenlétében tenyésztve - fokozott pantotenát termelést mutatnak. A továbbá deregulált *ilvBNC* és *ilvD* géneket hordozó törzsek csak β -alanin jelenlétében is fokozott pantotenát termelést mutatnak. További *panD* deregulációval β -alanintól független termelés érhető el.

A példaként felhasznált PA824 törzs triptofán prototróf, *Spec* és *Tet* rezisztens, a *panBCD* lókuszon deregulált *panBCD*-t, a *panE1* lókuszon deregulált *panE1*-t (két gén *B. subtilis* genomjában, amelyek homológok az *E. coli* *panE*, *panE1* és *panE2* génjeivel, az előbbi kódolja a pantotenát képződésben részt vevő fő

ketopantoát reduktázt, ugyanakkor *panE2* nem érintett a pantotenát szintézisben, ~~az 09/400,494 sorozatszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés szerinti,~~ az *ilvD* lókuszon deregulált *ilvD*-t tartalmaz, túlzottan kifejezi az *ilvBNC* kazettát az *amyE* lókuszon és túlzottan kifejezi a *panD* gént a *bpr* lókuszon. PA824 rutinszerűen körülbelül 40-50g/l pantotenátot termel 48 órán át 14 literes fermentorban standard fermentációs eljárás szerint tenyésztve, ~~(lásd a 60/263,053 sorozatszámú vagy a 60/262,995 sorozatszámú ideiglenes szabadalmi bejelentéseket, amelyeket itt referenciaként beépítettünk)~~ Röviden, nyomelemeket tartalmazó batch tápközeget (4,5 litert) oltunk be PA824 rázatott lombikos tenyészetével. A fermentációkat kontrollált hőmérsékleten (például 43 °C-on), kontrollált oldott oxigén szintnél és pH-n vezetjük, glükóz limitált fed batch eljárással. Miután a kiindulási glükóz mennyiség elfogyott, a glükóz koncentrációt friss FEED tápközeg folyamatos adagolásával körülbelül 0 és 1 g/l között tartjuk. A pH-t 7,2-re állítjuk be és folyamatosan mérve vagy ammónia- vagy foszforsav-oldat adagolásával tartjuk fenn. Az oldott oxigén koncentrációt [pO_2] körülbelül 10-30%-on tartjuk a keverés és a levegőztetés sebességének szabályozásával. A habzást megfelelő habzásgátló adagolásával akadályozzuk meg. A sejtek centrifugálással történő eltávolítása után a fermentlében meghatározzuk a pantotenát titert (HPLC analízissel).

A példaként felhasznált második törzs PA668. PA668 törzs PA824 származéka, amely amely *P₂₆panB* extra példányait tartalmazza megsokszorozva a *vpr* vagy *panB* lókuszon. PA668 törzset a *panB*

expressziós vektor (pAN636) felhasználásával állítottuk össze, amely lehetővé teszi többszörös példányok szelekcióját klóramfenikol alkalmazásával. Röviden, a pAN636 NotI restrikciós fragmentumát (vektor szekvenciákat kizárva) ligáltuk és azután felhasználtuk klóramfenikol szelekcióval PA824 transzformálására 5 µg/ml klóramfenikolt tartalmazó lemezekben. 30 µg/ml klóramfenikolra rezisztens transzformánsokat izoláltunk és screeneltünk pantotenát termelésre 48 órás kémcső tenyészetekben. Az izolátumok körülbelül 10%-kal több pantotenátot termelnek, mint PA824. Az első törzs PA668-2A, a PA824 törzzsel összehasonlítható mennyiségű pantotenátot termel 10 literes fermentorban, hasonló körülmények között tenyésztve (például körülbelül 45-50 g/l pantotenát 36 óra alatt). 36 óra elteltével, amikor a pantotenát termelés a PA824 törzzsel rutinszerűen elkezd lassulni, PA668-2A fermentációjában folytatódik a jelentős mennyiségű pantotenát termelődés (például körülbelül 60-65 g/l pantotenát 48 óra alatt)1.. A második törzs PA668-24, még gyorsabb sebességgel termel pantotenátot, 60-70 g/l-t elérve 48 óra alatt.

A harmadik termelő törzset, a PA721-39 jelűt, úgy alakítottuk ki, hogy tartalmazzon még egy amplifikálható *F₂₆panBpanD* kazettát a következők szerint. Először olyan egyedi expressziós kazettát állítottunk össze, amely képes mind *panB*-t, mind *panD*-t beépíteni a *bpr* lokuszra. A két gén egy expressziós kazettába történő kombinálása antibiotikum rezisztencia marker eltüntetésével egyszerűsíti az eredményül kapott törzset. A *F₂₆panBpanD* expressziós kazettát úgy állítottuk össze, hogy tartalmazza a két különböző *panD* riboszóma-kötő helyet (az RBS-eket korábban

szintetizálták és tesztelték a WO 01/21772 közzétételi számú nemzetközi szabadalmi bejelentésben, és az US 60/262,995 sorozat-számú szabadalmi bejelentésben). A kazetta tartalmazta továbbá a szintetikus *panB* riboszóma-kötő helyet (RBS1-et), a tervezés azonban megengedi a *panB* RBS későbbi módosítását egyszerű oligonukleotid kazetta szubsztitúcióval. Az összeállítás első lépésében a *panB* gént csatlakoztattuk a két *panD* gén kazettához a 3. ábra szerint, pAN665 létrehozása céljából. A következő lépésben az eredményül kapott *panBpanD* kazettákat vittük át pOTP61 *B. subtilis* expressziós vektorba a 4. ábra szerint. Az összeállított plazmidok (pAN670 és pAN674) lényeges tulajdonságait az 1. táblázatban mutatjuk be.

1. táblázat: Különböző *B. subtilis* *panBpanD* gén expressziós kazettákat tartalmazó plazmidok

Plazmid	<i>panD</i> RBS	Vektor	Gazda törzs
pAN665	standard	pASK-1BA3	<i>E. coli</i>
pAN670	standard	pOTP61	<i>B. subtilis</i>
pAN669	ND-C2	pASK-1BA3	<i>E. coli</i>
pAN674	ND-C2	pOTP61	<i>B. subtilis</i>

Ezek az új plazmidok egyedi vektorban kombinálják extra PanB és PanD termelését és a PA668-ban jelen levő *panB* expressziós vektorral (pAN636-tal) összehasonlítva várhatóan megnövekedett PanB mennyiségeket termelnek. A P_{26} *panBpanD* vektorok pantotenát termelő törzsekbe történő installációjának stratégiája a *bpr* és *panE1* közötti genetikai összekapcsolódást használja ki. Először PA824 származékát állítottuk össze, amely helyreállítja a rezidens *panD* expressziós kazettát a törzs PA930-ból (*panE1::cat*)

izolált kromoszómális DNS-sel való transzformálásával és klóramfenikol rezisztenciára történő szelekciójával. Az eredményül kapott transzformánsokat tetraciklin érzékenységre screeneltük és megőriztünk két Tet-szenzitív izolátumot, amelyeket PA715 jelzéssel láttunk el. Ez a törzs a gazda törzs a *P₂₆panBpanD* vektorok tesztelésére (lásd az alábbiakban). A *P₂₆panE1* kazetta PA715-be történő visszahelyezésére minden egyes vektort először olyan törzsbe (PA328-ba) transzformáltunk, amely tartalmazza *P₂₆panE1*-et, de nem tartalmaz a *bpr* lókusznál beépült kazettát. PA328 tartalmazza a *P₂₆panBCD* lókuszt, jóllehet ez a törzs nincs genetikailag átalakítva α -KIV túlzott termelésére. Tetraciklinre rezisztens PA328 transzformánsokat kaptunk a két vektorból a megfelelő NotI restrikciós fragmentumok felhasználásával és az eredményül kapott törzseket PA710 és PA714 jelzéssel láttuk el.

A következő lépés a kazetták PA715-be történő transzferje volt oly módon, hogy a PA824 törzs háttérében értékelhetők legyenek. Ezt úgy valósítottuk meg, hogy PA710 és PA714 törzsekből kromoszómális DNS-t izoláltunk és a két DNS-t külön-külön használtuk fel PA715 transzformálására, tetraciklin rezisztenciára történő szelekcióval. Tetraciklin rezisztens transzformánsokat screeneltünk klóramfenikol érzékenységre; ez azonosítja a kívánt transzformánsokat, amelyek a donor DNS-ből a *P₂₆panE1* gént is megszerezték a *P₂₆panBpanD* kazettához kapcsolva a *bpr* lókusznál. Klóramfenikolra érzékeny izolátumok olyan transzformációkból származtak, amelyekben PA710 vagy PA714 kromoszómális DNS-t használtunk donorként. A kémcső tenyészetben legmagasabb panto-

tenát titert termelő izolátumokat megőriztük. Ezeket a törzseket rendre PA717 és PA721 jelölésekkel láttuk el. Az új törzsekből ugyanúgy, mint a PA824 és PA715 törzsekből, két-két kémcső tenyészetet szaporítottunk SVY + 10 g/l aszpartát tápközegben 43 °C-on 48 órán keresztül és azután meghatároztuk a pantotenát, HMBPA és β -alanin mennyiségét. Ezenkívül minden egyes törzsből kivonatokat futtattunk SDS-PAGE gélen. A kémcső tenyészetekben kapott eredményeket a 2. táblázatban mutatjuk be.

2. táblázat: SVY + 10 g/l aszpartát tápközegben szaporított PA717 és PA721 törzsek pantotenát termelése

Törzs	panBD kazetta	[pan] g/l	[HMBPA] g/l	[β -ala] g/l
PA824	-	4,9	0,94	2,5
		4,6	0,79	2,3
PA715	nincs	1,7	< 0,1	0,5
		1,7	< 0,1	0,4
PA717-24	pAN670	4,8	0,34	1,3
		4,9	0,40	1,3
PA721-35	pAN674	5,7	0,50	1,4
		5,3	0,40	1,3
PA721-39	pAN674	4,1	0,38	2,0
		4,6	0,40	2,2

A vártak megfelelően, az új törzsek mindegyike több pantotenátot és β -alanint termelt, mint PA715. Két törzs (PA717-24 és PA721-39) körülbelül ugyanannyi pantotenátot termelt, mint PA824, míg PA721-35 több pantotenátot termelt PA824-nél. Mind a három új törzs kevesebb HMBPA-t termelt, mint PA824. A fehérje

gél analízis azt mutatta, hogy a három új törzs több PanB-t termel, mint bármelyik kontroll törzs.

A PA717-24, PA721-35 és PA721-39 törzseket rázatott lombikos tenyészetben is értékeltük szójaliszt alapú tápközegben. Ahogyan az a 3. táblázatban olvasható, ezek az amplifikálható P_{26panB} és P_{26panD} kazettával rendelkező törzsek hasonló szinten termeltek pantoténátot és HMBPA-t, mint az amplifikálható P_{26panB} és P_{26panD} kazettákat szeparáltan tartalmazó PA668-2 és PA668-24 törzsek.

3. táblázat: 48 órás rázatott lombikos kísérlet

Tápközeg	Törzs	[HMBPA] g/l	[pan] g/l
Szójaliszt + glükóz	PA668-2	1,2	6,8
	PA668-24	1,6	5,2
	PA717-24	2,0	5,9
	PA721-35	2,6	7,0
	PA721-39	2,5	8,6
Szójaliszt + maltóz	PA668-2	0,0	9,0
	PA668-24	0,4	10,4
	PA717-24	0,7	8,6
	PA721-35	1,0	9,2
	PA721-39	0,4	9,1

Körülmények: 40 ml tápközeg/200 ml-es rázatott lombik,

4X Bioshield tető, 300 rpm, 2,5% inokulum (1,0 ml);

Szójas tápközeg: 20 g/l Cargill 200/20 szójaliszt,

8 g/l ammónium-szulfát, 5 g/l glutamát, 1X PSTE, 0,1 M foszfát, pH 7,2 és 0,3 M MOPS pH 7,2, 60 g/l glükóz vagy maltóz /10 mM Mg és 1,4 mM Ca;

Két párhuzamos lombik átlaga.

Bemutattuk, hogy bizonyos törzsek, amelyeket a kívánt panto-

vegyület kereskedelmi léptékű termelésére alakítottunk át genetikailag, pantotenát (ugyanúgy, mint egyéb, az 1. ábrán bemutatott és itt leírt panto-vegyületek) termelésén kívül mellékterméket is előállítanak, amelyet 3-(2-hidroxi-3-metil-butiril-amino)-propionsavként (HMBPA) azonosítottunk. HMBPA-ra utalunk még a „ β -alanin-2-(R)-hidroxi-izovalerát”, „ β -alanin-2-hidroxi-izovalerát”, „ β -alanil- α -hidroxi-izovalerát” és/vagy „fantotenát” elnevezésekkel is (a „fantotenát” elnevezést „fan” rövidítéssel is használjuk itt).

HMBPA az [R]- α -hidroxi-izovaleriánsav (α -HIV) és β -alanin kondenzációs terméke, amely kondenzációt a PanC enzim katalizálja. α -HIV az α -KIV redukciójával jön létre, amely reakciót az α -keto-reduktáz enzimek, PanE (például PanE1 és/vagy PanE2) és/vagy IlvC katalizálják. Feltételeztük, hogy mikroorganizmusokban legalább két olyan bioszintézis útvonal létezik, amely a PanB bioszintetikus enzim szubsztrátjáért – α -KIV-ért – verseng, nevezetesen a pantotenát bioszintézis útvonal és a HMBPA bioszintézis útvonal. (A harmadik és negyedik α -KIV-ért versengő bioszintézis útvonal az, amelyik α -KIV-ből valint vagy leucint állít elő, lásd az 1. ábrát.) Legalább a pantotenát bioszintézis útvonal és a HMBPA bioszintézis útvonal előállít továbbá a PanC enzimért versengő szubsztrátokat, nevezetesen α -HIV-et és pantoátot. HMBPA termelődése jelentősen befolyásolja a pantotenát képződést. Például a HMBPA bioszintézis útvonal versenghet a pantotenát bioszintézis útvonallal az α -KIV és β -alanin prekursorokért és néhány enzimért (PanC, PanD, PanE1 és/vagy IlvC). Ezenkívül, mivel HMBPA szerkezete hasonló a pantotenátéhoz, lehet

olyan nemkívánatos sajátsága, hogy a pantotenát bioszintézis útvonalon egy vagy több lépést negatívan szabályoz. ~~HMBPA azonosítását alapul véve az US 60/262,995 sorozatszámú ideiglenes szabadalmi bejelentés leírja, hogy A pantotenát termelés bármely olyan eszközzel javítható vagy optimalizálható, amely előnyben részesíti α -KIV és β -alanin szubsztrátok és/vagy néhány enzim (PanC, PanD, PanE1 és/vagy IlvC) pantotenát bioszintézis folyamataiban történő felhasználását a HMBPA bioszintetikus folyamatokkal szemben.~~

II. példa: Pantotenát termelés növelése szerin hozzáférhetőségének növelésével

A pantotenát termelés optimalizálásának legalább egy módszere magába foglalja szerin hozzáférhetőségének szabályozását a mikroorganizmus tenyésztésében. Főképpen az szemléltethető, hogy szerin hozzáférhetőségének növelése növelheti a pantotenát termelést (például a HMBPA termeléshez viszonyítva), míg szerin hozzáférhetőségének csökkenése csökkenti a pantotenát termelést a HMBPA termeléshez képest. Ez a módszer azon az ismereten alapul, hogy a szerinből származó vegyület, a metilén-tetrahidrofolát (MTF) hidroximetil-csoportot ad át α -KIV-nek a pantotenát bioszintetikus reakció során és ketopantoát keletkezik (lásd az 1. és 2. ábrát). Ilyenformán tehát szerin szintek szabályozása a ketopantoát szintek hatékony szabályozásának eszköze, szabályozva a pantoát és/vagy pantotenát termelést genetikailag megfelelően átalakított mikroorganizmusokban. Ennek a szabályozásnak a bemutatására PA824 törzset szaporítottunk kémcső tenyésztésben SVY glükóz + 5 g/l β -alanin és $\pm$ 5 g/l szerin tápközegben 48 órán keresztül 43 °C-on.

4. táblázat: PA824 pantotenát és HMBPA termelése szerin hozzáadásával és anélkül

Szerin adagolás 5 g/l	OD ₅₀₀	[pan] g/l	[HMBPA] g/l
-	16,3	4,9	0,84
-	14,0	4,5	0,80
+	13,1	6,4	0,56
+	12,9	6,0	0,62

Az 4. táblázatban bemutatott adatok szerint szerin hozzáadása növeli a pantotenát képződés szintjét (ugyanakkor csökkenti a HMBPA termelést).

III. példa: Baktérium sejtek genetikai átalakítása megnövekedett szerin hidroximetil-transzferáz, *glyA* géntermék tartalomra

A pantotenát termelés szintjének szabályozása érdekében, a szerin adagolás alternatívájaként egy lehetőség szerin szintek és/vagy szerin felhasználási szintek (és ennek megfelelően metilén-tetrahidrofolát szintek) növelésére a 3-foszfoglicerát dehidrogenáz vagy szerin hidroximetil-transzferáz (a *serA* és *glyA* gén termékei) szintézisének vagy aktivitásának növelése, ilyenformán megnövelve a szerin és metilén-tetrahidrofolát bioszintézist genetikailag megfelelően átalakított mikroorganizmusokban.

A *glyA* gén kifejezését megnöveltük *B. subtilis* sejtek olyan expressziós kazettával történő transzformálásával, amely a *B. subtilis* *glyA* gént erős, konstitutív promóterhez képest downstream klónozva tartalmazta. Az expressziós kazetta elkészítéséhez az 5. táblázatban bemutatott RY417 és RY418 primereket használtuk fel *B. subtilis* PY79 kromoszómális DNS-éből izolált

glyA gén PCR megsokszorozására.

5. táblázat: *B. subtilis* glyA és serA megsokszorozásához felhasznált primerek

RY405	CCCTCTAGAGGAGGAGAAAACATGTTTCGAGTA TTGGTCTCAGACAAAATG	20. számú szekvencia
RY406	CCCGGATCCAATTATGGCAGATCAATGAGCTTC ACAGACACAA	21. számú szekvencia
RY417	GGATCTAGAGGAGGTGTAAACATGAAACATTTA CCTGCGCAAGACGAA	22. számú szekvencia
RY418	CGGGGATCCCCCATCAACAATTACACACTTCTA TTGATTCTAC	23. számú szekvencia

RY417 XbaI helytől downstream tartalmazza az RBS2 szintetikus riboszóma-kötő helyet. A megsokszorozott DNS-t ezután XbaI és BamHI restrikciós enzimekkel hasítottuk és a pAN004 vektor XbaI és BamHI helyei közé klónoztuk (5. ábra), hogy megkapjuk a pAN396 plazmidot (6. ábra, 24. számú szekvencia). A pAN004 vektor tartalmazza a fág SP01 P_{26} promótert közvetlenül upstream az XbaI klónozó helytől a klónozott glyA gén kifejeződésének irányítására. Az expressziós kazettától downstream pAN396 tartalmaz egy *B. subtilis*-ben működőképes cat gént. *B. subtilis* transzformálására a P_{26} glyA kazettát és a cat gént tartalmazó NotI DNS fragmentumot izoláltuk pAN396-ból, önmagába ligáltuk és transzformáltuk *B. subtilis* PY79 megfelelő sejtjeibe. Néhány klór-
amfenikolra rezisztens transzformánst kiválogattunk és PA1007 és PA1008 jelzéssel láttuk el. Ezen törzsek mindegyikéből kromoszómális DNS-t izoláltunk és felhasználtuk PA721B-39 és PA824 megfelelő sejtjeinek transzformálására, hogy megkapjuk a PA1011

és PA1014 törzseket. A kiválasztott PA1011 és PA1014 izolátumok sejtkivonatainak SDS-PAGE analízise megerősítette, hogy ezek a törzsek a szülői törzsekhez PA721B-39-hez (leírása az I. példában) és PA824-hez (WO 01/21772 közzétételi számú nemzetközi szabadalmi bejelentés) viszonyítva megnövekedett mennyiségű *glyA* génterméket tartalmaznak. A megnövekedett *glyA* kifejeződés pantotenát termelésre gyakorolt hatásának tesztelésére a PA1011 és PA1014 törzseket kémcső tenyészetben SVY glükóz + 5 g/l β -alanin tápközegben, 43 °C-on 48 órán át szaporítottuk. A 6. táblázatban bemutatott adatokból látható, hogy PA1014 több pantotenátot (4,5 g/l-t) termelt, mint a PA824 szülői törzs (3,2 g/l). Ehhez hasonlóan PA1011 átlagosan több pantotenátot (4,35 g/l-t) termelt, mint a PA721B-39 szülői törzs (4,05 g/l).

6. táblázat: PA1011 és PA1014 pantotenát és HMBPA termelése PA721B-39 és PA824 szülői törzsekkel összehasonlítva

Törzs	OD ₆₀₀	Pantotenát g/l	HMBPA g/l
PA1014 (1.)	14	4,5	0,27
PA1014 (2.)	15	4,5	0,31
PA824	16	3,1	0,31
PA824	15	3,3	0,28
PA1011 (1.)	17	4,5	0,24
PA1011 (2.)	12	4,2	0,27
PA721B-39	18	4,0	0,22
PA721B-39	16	4,1	0,25

IV. példa: Baktérium sejtek genetikai átalakítása megnövelt mennyiségű *serA* géntermék, 3-foszfoglicerát dehidrogenázra

A *serA* géntermék, 3-foszfoglicerát dehidrogenáz az első megfigyelt enzim a szerin bioszintézis útvonalon (lásd a 2. ábrát). Mivel szerin az MTF szintézis egyik szubsztrátja, a *serA* gén túlzott kifejezését alakítottuk ki a sejtben a szerin szintek növelése érdekében. A *glyA* génre fent a III. példában leírtakhoz hasonlóan a *serA* gén kifejeződését úgy növeltük meg, hogy *B. subtilis* sejteket transzformáltunk a *B. subtilis serA* gént erős konstitutív promóterhez downstream klónozva tartalmazó expressziós kazettával. Az expressziós kazetta összeállításához az 5. táblázatban bemutatott RY405 és RY406 primereket használtuk fel a *serA* gén PCR megsokszorozására *B. subtilis* PY79 törzsből izolált kromoszómális DNS-ből. A megsokszorozott DNS-t azután *Xba*I-gyel és *Bam*HI-gyel hasítottuk és klónoztuk a pAN004 vektor (5. ábra) *Xba*I és *Bam*HI helyei közé, hogy megkapjuk a pAN393 plazmidot (7. ábra; 25. számú szekvencia). *B. subtilis* transzformálására a F_{26} *serA* kazettát és a *cat* gént tartalmazó *Not*I DNS fragmentumot izoláltuk pAN393-ból, önmagába ligáltuk és transzformáltuk *B. subtilis* PY79 megfelelő sejtjeibe. Néhány klóramfenikolra rezisztens transzformánst kiválogattunk és PA1004 és PA1005 jelzéssel láttuk el. Ezen törzsek mindegyikéből kromoszómális DNS-t izoláltunk és felhasználtuk PA721B-39 és PA824 megfelelő sejtjeinek transzformálására, hogy megkapjuk a PA1010 és PA1013 törzseket. A kiválasztott PA1010 és PA1013 izolátumok sejt kivonatainak SDS-PAGE analízise megerősítette, hogy ezek a törzsek a szülői törzsekhez PA721B-39-hez és PA824-

hez viszonyítva megnövekedett mennyiségű serA génterméket tartalmaznak.

A megnövekedett serA kifejeződés pantotenát termelésre gyakorolt hatásának tesztelésére a PA1010 és PA1013 törzseket kémcső tenyészetben SVY glükóz + 5 g/l β -alanin tápközegeben, 43 °C-on 48 órán át szaporítottuk. A 7. táblázatban bemutatott adatokból látható, hogy PA1010 átlagosan több pantotenátot (4,7 g/l-t) termelt, mint a PA721B-39 szülői törzs (4,1 g/l). Ehhez hasonlóan PA1013 átlagosan több pantotenátot (4,1 g/l-t) termelt, mint a PA824 szülői törzs (3,1 g/l).

7. táblázat: PA1010 és PA1013 pantotenát és HMBPA termelése PA721B-39 és PA824 szülői törzsekkel összehasonlítva

Törzs	OD ₆₀₀	Pantotenát g/l	HMBPA g/l
PA1010 (3.)	16	4,8	0,23
PA1010 (5.)	15	4,5	0,26
PA1010 (6.)	22	4,7	0,24
PA721B-39	18	4,0	0,22
PA721B-39	16	4,1	0,25
PA1013 (2.)	14	3,3	0,25
PA1013 (4.)	14	4,2	0,28
PA1013 (5.)	16	5,5	0,37
PA1013 (8.)	13	3,6	0,24
PA824	17	3,0	0,27
PA824	16	3,1	0,29

V. példa: Ráztatott lombikos és fermentoros kísérletek megnövelt *serA* és *glyA* kifejezéssel rendelkező törzsekkel

Kémcső tenyészetek alapján amplifikálható *serA* kazettával rendelkező két törzset és amplifikálható *glyA* kazettával rendelkező két törzset választottunk ki és egy-egy szülői törzset, PA824-et és PA721B-39-et. A négy törzset a szülői törzsekkel együtt ráztatott lombikokban szaporítottuk (8. táblázat). A szójalisztes MOPS glükóz (Soy fluor MOPS Glucose = SMG) tápközegben mind a négy törzs több pantotenátot termelt, mint a szülői törzsek. A szójalisztes MOPS maltóz (Soy fluor MOPS Maltose = SMM) tápközegben a négy közül egy törzs mutatkozott kiválóbbnak a szülői törzsekhez képest.

Mindkét szülőtől származó, a *serA*-t túlzottan kifejező törzset és a *glyA*-t túlzottan kifejező törzset egyidejűleg 10 literes Chemap bench fermentorokban szaporítottuk. A PA824-ből származó, *glyA*-t túlzottan kifejező PA1014-3 törzs, amely SMM tápközegben a legmagasabb pantotenát titert eredményezte, fermentorban is a legjobbnak bizonyult (9. táblázat). A PA1014-3 törzs tenyészetének felülúszójában 36 óra után 71 g/l pantotenát, 48 óra után 86 g/l pantotenát képződését, ugyanakkor a szülői PA824 törzs megfelelő felülúszóiban 41 g/l és 46 g/l pantotenát termelődését mértük. A *serA*-t túlzottan kifejező PA1012-4 törzs szintén jelentősen több pantotenátot termelt a PA824 kontroll törzssel összevetve, a tenyészet felülúszójában 36 és 48 óra elteltével 52 g/l és 60 g/l pantotenátot mértünk. Ezek az eredmények világosan mutatják mind a *glyA*, mind a *serA* kifejezés növelésének hatékonyságát.

A PA721B-39 törzs *serA*-t és *glyA*-t túlzottan kifejező származékai egyértelműen jobbak, mint a szülői törzs. Mindkettő 80 g/l körüli (82 g/l és 79 g/l) pantotenátot termelt a 48 órás tenyészetek felülűszójában mérve. A PA721B-39-ből származó törzsek a PA824 származékokhoz képest megnövelt PanB szintjének hatása önmagában biztosítja HMBPA csökkenését. PA721B-39 és ennek származékai kevesebb HMBPA-t termeltek 48 óra után, mint PA824 vagy akár PA668-24. Úgy tűnik, hogy megnövekedett GlyA szint szintén csökkent a szénforrás HMBPA-vá alakulását.

8. táblázat: *serA*-t vagy *glyA*-t túlzottan kifejező pantotenát termelő törzsek rázatott lombikos eredményei

Szénforrás	Törzs	Hozzáadott kazetta	HMBPA g/l	Pantotenát g/l
Glükóz	PA824		3,5	4,0
	PA1012-4	<i>serA</i>	3,0	4,6
	PA1014-3	<i>glyA</i>	2,5	4,7
	PA721B-39		0,9	5,0
	PA1010-6	<i>serA</i>	1,9	9,6
	PA1011-2	<i>glyA</i>	1,7	10,0
Maltóz	PA824		1,2	10,4
	PA1012-4	<i>serA</i>	0,8	9,8
	PA1014-3	<i>glyA</i>	1,1	16,1
	PA721B-39		0,6	11,6
	PA1010-6	<i>serA</i>	0,5	10,2
	PA1011-2	<i>glyA</i>	0	10,3

Minden adat két párhuzamos lombik átlaga 48 órás tenyésztés után.

Körülmények: 40 ml tápközeg/200 ml-es rázatott lombik,

4X Bioshield tető, 300 rpm, 2,5% inokulum, 43 °C;

Tápközeg: 20 g/l Cargill 200/20 szójaliszt, 1X PSTE, 8 g/l ammónium-szulfát és 5 g/l glutamát.

Puffer: 0,1 M foszfát, pH 7,2 és 0,3 M MOPS pH 7,2,

Szénforrás (sterilizés szeparáltan 20x törzsoldatként): 60 g/l glükóz vagy maltóz /10 mM Mg és 1,4 mM Ca.

9. táblázat: serA-t vagy glyA-t túlzottan kifejező pantotenát termelő törzsek 10 literes fermentoros eredményei

Sorozat	Törzs	Szülői törzs	Hozzáadott kazetta	HMBPA g/l		Pantotenát g/l	
				36 ó	48 ó	36 ó	48 ó
P285	PA824			18	25	41	46
P284	PA1012-4	PA824	serA	20	21	52	60
P286	PA1014-3	PA824	glyA	14	16	71	86
P259	PA721B-39			4	5	34	42
P287	PA1010-6	PA721B-39	serA	4	5	65	82
P289	PA1011-2	PA721B-39	glyA	2	3	56	79
P275	PA668-24	PA824		3	9	55	72

Az alkalmazott tápközeg PFM-222. Ez ugyanaz, mint az US 60/262,995 sorozatszámú szabadalmi bejelentésben leírt PFM-155 tápközeg az alábbi eltérésekkel: 1) a batch tápoldatban: nincs Amberex 1003; Cargill 200/20 (szójaliszt) 40 g/l helyett Cargill 20-80 (szójadara) 50 g/l; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ helyett $\text{MgCl}_2 \times 7\text{H}_2\text{O}$; és SM-1000X helyett PSTE-1000X ($\text{PSTE-1000X} = \text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 2,0 g/l; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1,5 g/l; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 2,0 g/l; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g/l; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,75 g/l). 2) a rátáplálásnál: SM-1000X helyett PSTE-1000X.

A pantotenát termelés növelése elérhető *serA* és *glyA* egy törzsben történő túlzott kifejezésével és/vagy olyan mutáció bevezetésével is, amely feedback rezisztens *serA*-hoz vagy *glyA*-hoz vagy mindkettőhöz vezet.

A szakember csupán rutin kísérletek alkalmazásával képes az itt leírt találmány specifikus megvalósítási formáival egyenértékű változatok elkészítésére. ~~Az ilyen egyenértékű változatok az itt következő szabadalmi igénypontok oltalmi körébe tartoznak.~~

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás pantotenát fokozott termelésére, amely egy deregulált serA, mtrA, sul, fol, pab, gcv és/vagy glyA géntermékkel rendelkező mikroorganizmusnak pantotenát képződését fokozó körülmények között végzett tenyésztéséből áll.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, amelyben a mikroorganizmus

i) deregulált pantotenát (pan) bioszintézis útvonallal és

ii) deregulált serA, mtrA, sul, fol, pab, gcv, és/vagy glyA géntermékkel rendelkezik.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, amelyben a mikroorganizmusnak legalább két pantotenát bioszintetikus enzime deregulált.

4. A 2. igénypont szerinti eljárás, amelyben a mikroorganizmusnak legalább három pantotenát bioszintetikus enzime deregulált.

5. A 2. igénypont szerinti eljárás, amelyben a mikroorganizmusnak legalább legalább négy pantotenát bioszintetikus enzime deregulált.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, amelyben a mikroorganizmus deregulált ketopantoát hidroximetil-transzferázzal, deregulált ketopantoát reduktázzal, deregulált pantotenát szintetázzal és deregulált aszpartát- α -dekarboxilázzal rendelkezik.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, amelyben a mikroorganizmus továbbá deregulált izoleucin-valin (ilv) bioszintézis útvonallal rendelkezik.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, amelyben a mikroorganizmus legalább két izoleucin-valin (ilv) bioszintetikus enzime deregulált.

9. A 7. igénypont szerinti eljárás, amelyben a mikroorga-



nizmus legalább három izoleucin-valin (ilv) bioszintetikus enzi-
me deregulált.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, amelyben a mikroorga-
nizmus deregulált aceto-hidroxisav szintetázzal, deregulált
acetohidroxisav izomeroreduktázzal és deregulált dihidroxisav
dehidratázzal rendelkezik.

11. Az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás,
amelyben a mikroorganizmus legalább egy MTF bioszintetikus enzi-
me deregulált.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, amelyben a mikroorga-
nizmus deregulált glyA génnel rendelkezik.

13. A 11. igénypont szerinti eljárás, amelyben a mikroorga-
nizmus deregulált serA génnel rendelkezik.

14. A 11. igénypont szerinti eljárás, amelyben a mikroorganiz-
mus deregulált glyA génnel és deregulált serA génnel rendelkezik.

15. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, amelyben a
mikroorganizmus deregulált izoleucin-valin (ilv) bioszintézis
útvonallal rendelkezik.

16. A 15. igénypont szerinti eljárás, amelyben egy deregulált
pantotenát bioszintézis útvonallal, deregulált izoleucin-valin (ilv)
bioszintézis útvonallal és deregulált serA, mtrA, sul, fol, pab,
gcv és/vagy glyA géntermékkel rendelkező mikroorganizmus tenyésztése a mikroorganizmus 36 órán át való tenyésztése után 50 g/l-nél magasabb pantotenát szint termelését eredményezi.

17. A 16. igénypont szerinti eljárás, amelyben a mikroorga-
nizmus tenyésztése a mikroorganizmus 36 órán át való tenyésztése
után 60 g/l-nél magasabb pantotenát szint termelését eredményezi.

18. A 17. igénypont szerinti eljárás, amelyben a mikroorga-
nizmus tenyésztése a mikroorganizmus 36 órán át való tenyésztése

után 70 g/l-nél magasabb pantotenát szint termelését eredményezi.

19. A 15. igénypont szerinti eljárás, amelyben egy deregulált pantotenát bioszintézis útvonallal, deregulált izoleucin-valin (ilv) bioszintézis útvonallal és deregulált serA, mtrA, sul, fol, pab, gcv és/vagy glyA géntermékkel rendelkező mikroorganizmus tenyésztése a mikroorganizmus 48 órán át való tenyésztése után 60 g/l-nél magasabb pantotenát szint termelését eredményezi.

20. A 19. igénypont szerinti eljárás, amelyben a mikroorganizmus tenyésztése a mikroorganizmus 48 órán át való tenyésztése után 70 g/l-nél magasabb pantotenát szint termelését eredményezi.

21. A 19. igénypont szerinti eljárás, amelyben a mikroorganizmus tenyésztése a mikroorganizmus 48 órán át való tenyésztése után 80 g/l-nél magasabb pantotenát szint termelését eredményezi.

22. Az 1-21. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, amelyben a pantotenát termelést pantotenát kináz aktivitás szabályozásával tovább fokozzuk.

23. A 22. igénypont szerinti eljárás, amelyben a pantotenát kináz aktivitást csökkentjük.

24. A 23. igénypont szerinti eljárás, amelyben a CoaA deletált és a CoaX alulexpresszált.

25. A 23. igénypont szerinti eljárás, amelyben a CoaX deletált és a CoaA alulexpresszált.

26. A 23. igénypont szerinti eljárás, amelyben CoaA és CoaX alulexpresszált.

27. Az 1-26. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, amelyben a mikroorganizmust 2,5 g/l-nél több szerin jelenlétében tenyésztjük.

28. Eljárás pantotenát termelésére, amelyben egy deregulált pantotenát (pan) bioszintézis útvonallal rendelkező mikroorga-

55267

nizmust 2,5 g/l-nél több szerin jelenlétében tenyésztve pantotenát termelődik.

29. Az 1-28. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, amelyben a mikroorganizmus egy Gram-pozitív mikroorganizmus.

30. Az 1-29. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, amelyben a mikroorganizmus a *Bacillus* nemzetségbe tartozik.

31. Az 1-30. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, amelyben a mikroorganizmus *Bacillus subtilis*.

32. Rekombináns mikroorganizmus pantotenát fokozott termelésére, amely mikroorganizmus deregulált pantotenát (pan) bioszintézis útvonallal és deregulált *serA*, *mtrA*, *sul*, *fol*, *pab*, *gcv* és/vagy *glyA* géntermékkel rendelkezik.

33. Rekombináns mikroorganizmus pantotenát fokozott termelésére, amely mikroorganizmus deregulált pantotenát bioszintézis útvonallal, deregulált *serA*, *mtrA*, *sul*, *fol*, *pab*, *gcv* és/vagy *glyA* géntermékkel és deregulált izoleucin-valin (*ilv*) bioszintézis útvonallal rendelkezik.

34. A 32. vagy 33. igénypont szerinti mikroorganizmus, amely továbbá csökkentett pantotenát kináz aktivitással rendelkezik.

35. A 32-34. igénypontok bármelyike szerinti mikroorganizmus, amely egy Gram-pozitív mikroorganizmus.

36. A 32-34. igénypontok bármelyike szerinti mikroorganizmus, amely a *Bacillus* nemzetségbe tartozik.

37. A 32-34. igénypontok bármelyike szerinti mikroorganizmus, amely *Bacillus subtilis*.

A meghatalmazott:


Ráthonyi Zoltán
Országos Széchenyi Igazgatóság
az S.B.T. és E. Széchenyi Igazgatóságoknál
1106
11-002 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 06-1-4601 Fax: 06-1-4602

77.169/BERA2ip2

Phalao Colar
2011-04-14

(SZEKVENCIÁK JEGYZÉKE)

SEQUENCE LISTING

<110> OmniGene BioProducts, Inc. et al.

<120> MICROORGANISMS AND PROCESSES FOR ENHANCED PRODUCTION OF PANTOTHENATE

<130> BGI-151PC

<140>

<141>

<160> 25

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 194

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:promoter
sequence

<220>

<221> -35_signal

<222> (136)..(141)

<220>

<221> -10_signal

<222> (159)..(164)

<400> 1

gotattgacg acagctatgg ttcaactgtcc accaaccaaa actgtgctca gtacogccaa 60

tattttotccc ttgaggggta caaagaggtg tccctagaag agatccacgc tgtgtaaaaa 120

ttttacaaaa aggtattgac ttccoctaca ggggtgtgtaa taatttaatt acagycgggg 180

gcaacccccc ctgt 194

<210> 2

<211> 163

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:promoter
sequence

<220>

<221> -35_signal

<222> (113)..(118)

<220>

<221> -10_signal

<222> (136)..(141)

<400> 2
 gctacctag cttccaagaa agatatccta acagcacaag agcggaaaga tgttttggtc 60
 tacatccaga acaactcttg ctaaaattcc tgaaaaattt tgcaaaaagt tgttgacttt 120
 atctacaagg tgtggtataa taactctaac aacagcagga cgc 163

<210> 3
 <211> 127
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:promoter
 sequence

<220>
 <221> -35_signal
 <222> (34)..(39)

<220>
 <221> -10_signal
 <222> (58)..(63)

<220>
 <221> -35_signal
 <222> (75)..(80)

<220>
 <221> -10_signal
 <222> (98)..(103)

<400> 3
 gaggaatcat agaattttgt caaaataatt ttattgacaa cgtcttatta acgttgatat 60
 aatttaaatt ttatttgaca aaaatgggct cgtgttgtag aataaatgta gtgaggtgga 120
 tgcaatg 127

<210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:ribosome
 binding site

<400> 4
 taaacatgag gaggagaaaa catg 24

<210> 5
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:ribosome
 binding site

<400> 5
attcgagaaa tggagagaat ataatatg

28

<210> 6
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:ribosome
binding site

<400> 6
agaaaggagg tga

13

<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:ribosome
binding site

<220>
<223> All occurrences of n = any nucleotide

<400> 7
ttaagaaagg aggtgannnn atg

23

<210> 8
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:ribosome
binding site

<220>
<223> All occurrences of n = any nucleotide

<400> 8
ttagaaagga ggtgannnnn atg

23

<210> 9
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:ribosome
binding site

<220>
<223> All occurrences of n = any nucleotide

<400> 9
agaaaggagg tgannnnnnn atg

23

<210> 10
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:ribosome
binding site

<220>
<223> All occurrences of n = any nucleotide

<400> 10
agaaaggagg tgannnnnna tg

22

<210> 11
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:ribosome
binding site

<400> 11
ccctctagaa ggaggagaaa acatg

25

<210> 12
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:ribosome
binding site

<400> 12
ccctctagag gaggagaaaa catg

24

<210> 13
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:ribosome
binding site

<400> 13
ttagaaagga ggatttaa atg

23

<210> 14
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:ribosome
binding site

<400> 14
ttagaaagga ggtttaatta atg 23

<210> 15
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:ribosome
binding site

<400> 15
ttagaaagga ggtgatttaa atg 23

<210> 16
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:ribosome
binding site

<400> 16
ttagaaagga ggtgtttaaa atg 23

<210> 17
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:ribosome
binding site

<400> 17
attcgagaaa ggaggtgaat ataatatg 28

<210> 18
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:ribosome
binding site

<400> 18
attcgagaaa ggaggtgaat aataatg 27

<210> 19
<211> 28
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:ribosome binding site

<400> 19

attcgtagaa aggaggtgaa ttaatatg

28

<210> 20

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5' PCR primer for serA gene

<400> 20

ccctctagag gaggagaaaa catgtttcga gtattggtot cagacaaaat g

51

<210> 21

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3' PCR primer for serA gene

<400> 21

cccggtacca attatggcag atcaatgagc ttcacagaca caa

43

<210> 22

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5' PCR primer for glyA gene

<400> 22

ggatctagag gaggtgtaaa catgaaacat ttacctgcgc aagacgaa

48

<210> 23

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3' PCR primer for glyA gene

<400> 23

cggggatccc coactcaaaa ttacacactt ctattgattc tac

43

<210> 24

<211> 7926

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> serA overexpression plasmid

<400> 24

```

gaatttttgcg gccgcttcga aagctgtaat ataaaaaact tcttcaacta acgggggcagg 60
tragtgcacat tagaaaaacg actgtaaaaa gtacagtcgg catttatotca tattataaaa 120
gccagtcatt aggcotatat gacaattcct gaatagagtt cataaacaat cctgcattgat 180
aaccatcaca aacagaatga tgtacctgta aagatagcgg taaatatatt gaattacott 240
tattaatgaa ttttctgct gtaataatgg gtagaaggta attactatta ttattgatat 300
ttaagttaaa ccaggtaaa gaagtccatg gaataataga aagagaaaaa gcatttttcag 360
gtatagggtg tttgggaaac aatttccccg aaccattata tttctotaca tcagaaaggt 420
ataaatcata aaactctttg aagtcattct ttacaggagt ccaaatacca gagaatgttt 480
tagatacacc atcaaaaatt gtataaagtg gctctaaott atoccaaataa cctaactctc 540
cgtcgttaht gtaaccagtt ctaaaagctg taittgagtt tatcaccctt gtcaactaaga 600
aaataaahgc agggtaaaat ttatatcctt ctgtttttat gtttcggtat aaaacactaa 660
tatcaatttc tgtggttata ctaaaagctg tttgttggtt caaataatga ttaaatatct 720
ctttctctct ccaattgtct aaatcaattt tattaaagtt catttgatat gctctctaaa 780
tttttatcta aagtgaattt agggaggctta ctgtctgct tttcttahta gaatcaahc 840
ttttttaaaa gtcaatatata ctgtaacata aatakatatt ttaaaaaat cccactttat 900
ccaattttcg tttgttgaa taatgggtgc tttagttgaa gaataaagac cacattaaaa 960
aatgtgggtc tttgtgtttt ttaaaaggat ttgagcgtag cgaaaaaatc tttctttct 1020
tatcttgata ataagggtaa ctattgaatt cgttaccacg agtttgtaga aacgcaaaaa 1080
ggccatccgt caggatggcc ttctgcttaa tttgatgcct ggcagtttat ggcgggcgtc 1140
ctgcgcgcca cctccgggc cgttgcttcg caacgttcaa atccgctccc ggoggatttg 1200
tctactcag gagagcgttc accgacaaa aacagataaa acgaaaggcc cagctcttgc 1260
actgagcctt tgtttttatt tgatgcctgg cagttcccta ctctcgcatg gggagacccc 1320
acactaccat cggcgctacg gcgtttcaot tctgagttcg gcattgggtc aggtgggaac 1380
acgcgctac tgcgcacag caaattctgt ttatocagac cgtttctgcg ttctgattta 1440
atctgtatca ggctgaaaat ctctctctat cgcacaaaac aggatccaat tatggcagat 1500
caatgagctt cacagacaca atatcaggga catttgtag ttctttcaca attttatctt 1560
ccagatgtct gtcaaaggaa agcatcatga tggcttctcc gctttttcc ttaaggccaa 1620
cctgcattgt tgcattgtta atatcattat ctccgagaa acgtctact cggccgatga 1680
cacctgttgt atcttgatgc tggatataca ccaagtgaac agtcggataa aaatcaatat 1740
taaatccatt gatctcgaca attcgtttct cgaatgagg aatatacgtt gccgttacag 1800
taaagggtgt cgggtctcct gtcaatttta cgtgatgca gttatcgtat ccagattcag 1860
aagaggaaat tttttcactg aagctaattg ccgttcttt tgcgacaccc ccggcattga 1920
cctcattaac agtagagttc acgcgcggtt ttaaaaagcc tgacagaagg gcttttgtaa 1980
tgaacgatgt ttcaagttta gcaattgtgc ctcatattg aatggcaaca tctgtactg 2040
gtctttctc gactgtgat acaaggctgc caattttcc tgcaatttga tggtaaggct 2100
taatttttag aaattcatct tttgtcatgg caggcaggtt gatagctgac atgacaggca 2160
ggccttttgc gaaactgcaga acttctctct acacttgggc ggcgacattg agctgtgctt 2220
ctttcgttga tgcctccaa tggaggatgg caatgactaa tggatgatca acaagtttgt 2280
tgtcaactgg cggttcgact tcgaaaacgt caagcgtgc tcccgcaaca tgcccgttt 2340
ccaaagcttc gagaagtgt gttcatcga taattccgcc tcgcgcacag ttaattaagc 2400
gaacgccttt tttcgttttt gcaatcgttt ctthattcaa taagcctttt gtttctttt 2460
ttaaaggcgt gtgaacggta atgahatccg cactttcaag cactttctca aatgtacggc 2520
tgtttacgcc gatttttttt gctctttctt ccgttaagaa aggatcaaaa acgtgcacag 2580
tcataccgaa cgtccctcga cgtgttgcaa tttcacttcc gattcggcct aatcctacaa 2640
taocaaagct ttttcoataa agctctgaa cgcataagc tgtgcgggtt cactctctgg 2700
atttcaotga gatattagcc tgggaatgt gtctcattaa agaagagatc attgcaaatg 2760
tatgctcagc tgcgaaatg gtgttgccgt tcggagcatt gatcacgatt accccgtgtt 2820
togtagcctc atcaatatcg atattatoga caccgacacc ggtcttccg acaattttta 2880
aagaagatcat tttgttgaaa aggtcttctg ttacttttgt cgcgcttcgc accaaaagag 2940
atcaaaaagt atgttaattc tcttctgcct ctgtacgtt ttttgaaag atttcaataa 3000
agtctgattc aataagtggc tgtaaacctg tttgtctgat tttgtctgag accaatactc 3060
gaaacatgtt ttctctctct cttagagcgtc ctgctgttgt taagattatt ataccacacc 3120
ttgtagataa agtcaacaa tttttgcaaa atttttcagg aatttttaga gaggttgttc 3180
tggatgtaga acaaaacatc tttccgctct tgtgtgtta ggatacttt ctgggaagct 3240
aggtaggcct cgagttatgg cagttggtta aaaggaaaca aaaagacgtt tttcacacaa 3300
aacggtcttt ttogatttct ttttacagtc acagocactt ttgcaaaaac cggacagctt 3360

```

catgccttat	aaotgctggt	tccgtcgaca	agcttcgqga	agcggccgca	aaattoactg	3420
gcogtgcgtt	tacaacgtog	tgaotgggaa	aaocctggog	ttacccaact	taatcgocct	3480
gcagcacatc	cccttttrog	cagotggcgt	aatagcgaa	aggcccgac	cgatcgocct	3540
tcccaacagt	tgcgcagoc	gaatggcgaa	tggcgccctga	tgcggtattt	tctccttaag	3600
catctgtgog	gtatttcaca	cgcctatagg	tgcactctca	gtacaatctg	ctctgatgoc	3660
gcatagttaa	gccagocccg	acacccgcca	acacccgctg	actatgcttg	taaaccgctt	3720
tgtgaaaaaa	tttttaaaat	aaaaaagggg	acctctaggg	tccccaatta	attagtaata	3780
taatctatta	aaggctcatc	aaaaggctcat	ccacoggatc	agcttagtaa	agocctcgct	3840
agattttaat	goggatgttg	cgattacttc	gccaaactatt	gcgataacaa	gaaaaagcca	3900
gcctttcatg	atatatctcc	caatttgtgt	agggcttatt	atgcacgctt	aaaaataata	3960
aaagcagact	tgccttgata	gtttggcgtg	gagcaattat	gtgcttagtg	catctaacgc	4020
ttgagtttaag	cgcgcgcgcg	aaagcggcgt	ggcttgaaog	aattgttaga	cattatttgc	4080
cgactacott	ggtgatctcg	cctttcacgt	agtggaacaa	ttcttccaac	tgatctgcgc	4140
gcgaggccaa	gcgatcttct	tcttgtccaa	gataagcctg	tctagcttca	agtatgacgg	4200
gctgatactg	ggccggcagg	cgctccattg	ccagctgggc	agcgacatcc	ttcggcgcg	4260
ttttgcgggt	tactgcgctg	taccaaagtc	gggacaacgt	aagcaactaca	tttcgctcat	4320
cgccagccca	gtcggggcgc	gagttccata	gcgttaaggt	ttcattttagc	gctccaaata	4380
gatcctgttc	aggaaccgga	tcaaagagtt	cctocggcgc	tggacotacc	aaggcaacgc	4440
tatgttctct	tgcctttgtc	agcaagatag	ccagatcaat	gtcgatogtg	gctggctoga	4500
agatacctgc	aagaatgtca	ttgcgctgoc	attctccaaa	ttgcagttcg	cgcttagctg	4560
gataacgcca	cggaaatgat	tgcctgtgca	caacaatggg	gacttctaca	gcgcggagaa	4620
tctcgctctc	tccaggggaa	gcogaagttt	ccaaaaggtc	gttgatcaca	gctcgccgcg	4680
ttgtttcatc	aagccttacc	gtcacccgtaa	ccagcaaatc	aatatcactg	tgtggcttca	4740
ggccgcacac	cactgcggag	cogtacaacat	gtacggccag	caaogtcggg	tccagatggc	4800
gctgatgac	gccaaactacc	tctgatagtt	gagtcgatac	ttcggcgatc	acogcttccc	4860
tcctgatgtt	taactttgtt	ttagggcgac	tgccttgctg	cgtaacatcg	ttgtgtctcc	4920
ataacatcaa	acatcgaccc	acggcgtaac	cgttgctgct	cctggatgoc	cgaggcatag	4980
actgtacccc	aaaaaaacag	tcataacaag	ccatgaaaac	cgcacactgg	cogttaaccac	5040
cgctgcgttc	ggtcaagggt	ctggaccagt	tgggtgagcg	cataogctac	ttgcattaca	5100
gcttacgaac	cgaacagggt	tatgtccact	gggttcgtgc	cttcacccgt	ttccacgggt	5160
tgcgtcaccc	ggcaaccttg	ggcagcagcg	aagtcgaggg	atttctgttc	tgggtggcga	5220
acgagcgcaa	ggttttcggc	tccacgcac	gtcagggcatt	ggcgcccttg	ctgttctctc	5280
acggcaagggt	gctgtgcaog	gatctgcctc	ggcttcagga	gatcggaaga	cctcggccgt	5340
cgcggcgctt	gcgggtgggt	ctgaaccccg	atgaagtggg	tgcctcctc	ggtttctctg	5400
aaggcgagca	tcgtttggtc	gccagccttc	tgtatggaac	gggcatggcg	atcagtgagg	5460
gtttgcaact	gcgggtcaag	gatctggatt	tccatccacg	cccgatcctc	gtcggggagg	5520
gcaagggctc	caaggatcgg	gccttgatgt	taccogagag	cctggcaccc	agocctgcgc	5580
agcaggggaa	ttgatccggt	ggatgacott	ttgaatgacc	tttaatatag	tataattacta	5640
attaattggg	gacootagag	gtcccctttt	ttatttthaa	aattttttca	caaaacgggt	5700
tacaagcata	acgggttttg	ctgcccgcaa	cggcgctgtt	ctgggtgttc	tagtttgta	5760
tcagaatcgc	agatccgggt	tcaggtttgc	cggctgaaag	cgctatttct	tccagaaattg	5820
ccatgatatt	ttcccccacg	gaggcgtcac	tggctcccgt	gttgtcggca	gctttgattc	5880
gataagcagc	atcgccctgt	tcaggctgtc	tatgtgtgac	tgttgagctg	taacaagttg	5940
tctcaggtgt	tcaatttcat	gttctagttg	ctttgtttta	ctggtttcac	ctgttctatt	6000
aggtgtttaca	tgcgtttcat	ctgttacatt	gtcgatctgt	tcatgggtgaa	cagcttthaaa	6060
tgcacccaaa	actcgtaaaa	gctctgatgt	atctatcttt	tttaacccgt	tttcatctgt	6120
gcataatgac	agttttccct	ttgatattca	aoggtgaaca	gttghtctac	ttttgtttgt	6180
tagtcttgat	gcttcaactga	tagatacaag	agccataaga	acctcagatc	cctcogtatt	6240
tagccagtat	gttctctagt	gtggttcggt	gtttttgcgt	gagccatgag	aacgaaccat	6300
tgagatcatg	cttacttttg	atgtcactca	aaaattttgc	ctcaaaaactg	gtgagctgaa	6360
tttttgcagt	taaaagcatg	tgtagtgttt	ttcttagtcc	gthacgtagg	taggaatcgg	6420
atgtaatggt	tgttggtatt	ttgtcaccat	tcatttttat	ctgggtgttc	tcaagttcgg	6480
ttacgagatc	catttgtcta	tctagttcaa	ccttgaaaat	caacgtatca	gtcgggcggc	6540
ctcgtttatc	aaccaccaat	ttcatattgc	tgtaaagtgt	taaatcttta	cttattgggt	6600
tcaaaaccca	ttggttaaag	cttttaaat	catggtagtt	attttcaagc	attaacatga	6660
acttaaatcc	atcaaggcta	atctctatat	tgccttggtg	agttttcttt	tgtgttagtt	6720
cttttaataa	ccactcataa	atcctcatag	agtatttgtt	ttcaaaaagac	ttaacatggt	6780
ccagattata	ttttatgaat	tttttaact	ggaaaagata	aggcaatata	tttcaactaa	6840
aaaactaatc	taatttttgc	cttgagaact	tggcatagtt	tgtccactgg	aaaactcmaa	6900
agccttttaac	caaaggattc	ctgattttca	cagttctcgt	catcagctct	ctggttggtt	6960
tagctaatac	accataagca	ttttccctac	tgatgttcat	catctgagcg	tattgggttat	7020

```

aagtgaaga taccgtccgt tttttccttg tagggtttcc aatcgtgggg ttgagttagtg 7080
ccacacagca taaaatttagc ttgggtttcat gtcocgttaa gtcatagcga ctaatcgota 7140
gttcatttgc ttgaaaaaca actaattcag acatacatct caattgggtct aggrgatttt 7200
aatcactata ccaattgaga tgggctagtc aatgataatt actagtcttt ttcttttgag 7260
ttgtgggtat ctgtaaatcc tgctagacct ttgctggaaa acttgtaaat totgctagac 7320
cotctgtaaa ttccgtctaga cctttgtgtg ttttttttgt ttatattcaa gtggttataa 7380
tttatagaat aaagaaagaa taaaaaaga taaaaagaat agatcccagc cctgtgtata 7440
actcactact ttagtcagtt ccgcagtatt acaaaaggat gtgcacaaag ctgtttgctc 7500
ctctacaaaa cagaccttaa aacccctaaag gcttaagtag caccctcgca agctcgggca 7560
aatcgctgaa ttttcttttt gtctccgacc atcaggcacc tgagtogctg tcttttttgt 7620
gacattcagt tgcgtgcgt caccgctctg gcagtgaatg ggggtaaatg gcactacagg 7680
cgcccttttat ggattcatgc aaggaaacta ccataatac aagaaaagcc cgtcacgggc 7740
ttctcagggc gttttatggc gggctctgta tgtgtgtcta tctgactttt tgcgtttcag 7800
cagttcctgc cctctgattt tccagctcga ccacttcgga ttatccogtg acaggtcatt 7860
cagactggct aatgcaccca gtaaggcagc ggtatcatca acaggcttac cgtcttact 7920
gtcaac 7926

```

<210> 25

<211> 7701

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> glyA overexpression plasmid

<400> 25

```

gaattttgag gccgcttcga aagctgtaat ataaaaacot tcttcaacta acgggggcagg 60
ttagtgcacat tagaaaaacg actgtaaaaa gtacagtcgg cattatctca tattataaaa 120
gocagtoatt aggcctatct gacaattcct gaatagagtt cataaacaat cctgcctgat 180
aaccatcaca aacagaatga tgtacctgta aagatagcgg taaatatatt gaattacott 240
tattaatgaa ttttctgtct gtaataatgg gtagaaggta attactatta ctattgatat 300
ttaagttaaa ccagtaaat gaagtcctat gaataataga aagagaaaaa gmattttcag 360
gtataggtgt tttgggaaac aatttccctg aaccattata tttctctaca tcagaaaggt 420
ataaatcata aaactctttg aagtcattct ttacaggagt ccaaatacca gagaatgttt 480
tagatacaac atcaaaaaatt gtataaagtg gctctaactt atcccaataa cctaactctc 540
cgctgcctatt gtaaccagtt ctaaaagctg tatttgagtt tatcacccct gtactaaga 600
aaataaatgc agggtaaaat ttatatcctt cttgttttat gtttcgggtat aaacactaa 660
tatcaatttc tgtgtttata ctaaaagtcg tttgttggtt caaataatga ttaaatactc 720
cttttctctt ccaattgtct aaatcaattt tattaaggtt catttgatat gctcctctaa 780
tttttatota aagtgaattt agggagctta ctgtctgtct ttcttcaatta gaatcaatcc 840
ttttttaaaa gtcaatatta ctgtaacata aatatatatt ttaaaaaat cccactttat 900
ccaattttct tttgttgaa caatgggtgc tttagttgaa gaataaagac cacattaaaa 960
aatgttgtct tttgtgtttt tttaaaggat ttgagcgtag cgaataatcc tttctttctt 1020
tatcttgata ataagggtaa ctattgaatt cggtaaccaag agtttgtaga aacgcaaaaa 1080
ggccatccgt caggatggcc ttctgtctaa tttgatgctt ggcagtttat ggcgggctc 1140
ctgcocgcca cctccgggc cgttgctctg caacgttcaa atccgctccc ggcggatttg 1200
tctactcag gagagcgttc accgacaaac aacagataaa acgaaaggcc cagttcttct 1260
actgagcctt tctgttttatt tgatgcctgg cagttcccta ctctcgcatg gggagacccc 1320
acactaaccat cggcgctacg gogtttctct totgagttcg gcattgggtc aggtgggacc 1380
accgcgctac tgcgcgcagg caaattctgt tttatcagac cgttctctcg ttctgattta 1440
atctgtatca ggtgaaaat cttctctcat ccgcaaaaa aggatcccc atcaacaatt 1500
acacacttct attgattcta caaaaaaga cattgagttt caagaacatc gtcaaaaaac 1560
cgcgcgggca taagcccaag cgggttttag gatcttaata atctaattct ttatataaag 1620
gaaattttat agtcagagca gctacaogct gtcttgcttc ttcaagtttt ccttcatctt 1680
cgtgtgtttt caatgcaagc goaatgatag caccgacttc ttctaagtcg tctccgtcaa 1740
aaacgcgggt ggttacagca gctgtaccaa gacggatgac gcttggttac aaaggttttt 1800
caggatcata tggaaatcgg tttttgttag acgtaatacc aatttcattc agtacatgct 1860
ccgcaacctt accagtcagt ccgagcgaaac gaaggtcaac aaggataagg tgggtgtctg 1920
ttccgcctga aacgagctgg atgcctctt tctttaaggo ttcagccaga cgtttcgcgt 1980

```

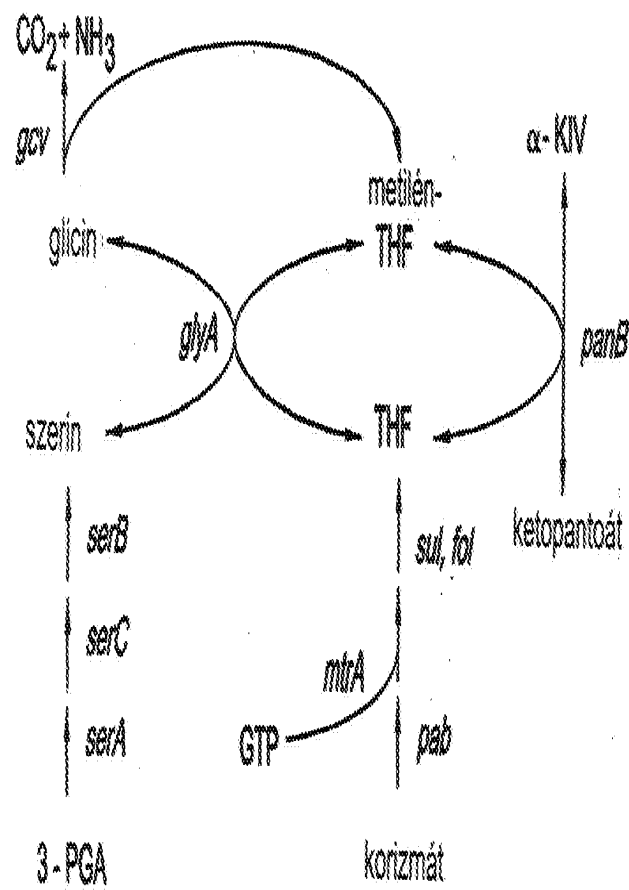
ttgaaatgac	gttttgtgca	tatgttttga	aatcgtctcg	caatacttca	ccgaatgaaa	2040
cagcttttgo	gycaataaag	tgcatcagag	ggcgccttg	aattccaggg	aagatogatt	2100
tatcaatttt	cttgccaaac	tcttccaggg	aaaggatcat	accgcgcga	ggaccgogaa	2160
gtgttttatg	tgttgtgtgt	gtaacgaaat	cagcgttaag	aaccgggttt	ggatgaaggc	2220
ctgcgcgaac	aagtctgcg	atatgtgcca	tatccaccat	gaagtaagcg	cgcacttcat	2280
cagcaatttt	acggaatttc	ttaaagtoga	ttgtacgagg	atacgcactt	gctcctgcta	2340
cgataagctt	cggttttatga	gcgagggctt	tttccagcac	gicactgtaa	tcaatatatt	2400
gagtttcttt	atctacgcgc	tactcaacaa	agttatatgt	aacacgcgtg	aagttgaatg	2460
ggcttccgtg	tgttaaattg	cgcgcgtggg	agaggttcat	cccaagtaca	gtatcgcctt	2520
gctccaaaa	cgtgaagtac	actgccatgt	ttgcttgtgc	gcctgaatga	ggctgaacgt	2580
ttacahgctc	cgtcccaaa	atttcccttg	cgcggtcacg	ggcgatctct	tcaacgacat	2640
cgaoghgtoc	gcattccgcg	tagtagcgtt	tgcccggtat	tcttctgtcg	tactttattg	2700
tcaaaacaga	tccttgtgct	tcataaacgc	cttcacttac	aaagttctca	gaagcaatca	2760
attogatctt	agtctgttgg	cgttcacgct	catttttaat	ggcgttaaac	acttggtcgt	2820
cttgccgagg	taaatgtttc	atgtttacac	ctcctctaga	gcgtcctgct	gttggttaaga	2880
ttattatacc	acacottgta	gataaagtca	acaacttttt	gcataatttt	tcagggaattt	2940
tagcagaggt	tgtttotggat	gtagaacaaa	acatctttcc	gctcttgtgc	tgttaggata	3000
tctttcttgg	aagctaggtg	ggcctcgagt	tatggcagtt	ggttaaaaag	aaacaaaaag	3060
accgttttca	cacaaaaacg	tcttttttga	tttcttttta	cagtcacagc	cactttttgca	3120
aaaaacggac	agcttcatgc	cttataactg	ctgtttcggt	cgacaagctt	cgcgaaagcg	3180
cgcacaaatt	cactggccgt	cgttttacaa	cgctcgtgact	gggaaaaacc	tggcggttacc	3240
caacttaate	gccttgccgc	acatccccct	ttcgccagct	ggcgtaatat	cgaagagggcc	3300
cgcacogato	gccttcccca	acagttgccc	agcctgaatg	gcgaatggcg	cctgatgcgg	3360
tattttctcc	ttacgcattc	gtgcggtatt	tcacacogca	tatggtgcac	tctcagtaca	3420
atctgctctg	atgcgcgata	gttaagccag	cccggaacac	cgcaaacacc	cgtgactact	3480
gcttgttaaa	cgttttgtga	aaaaattttt	aaaataaaaa	aggggacctc	tagggctccc	3540
aattaattag	taataatgat	tattaaaggt	cattcaaaaag	gtcatccacc	ggatcagctt	3600
agtaaaagccc	tcgctagatt	ttaatgcgga	tgttgcgatt	acttcgocaa	ctattgcgat	3660
aacaagaaaa	agccagcctt	tcatgatata	tctcccaatt	tgtgtagggc	ttattatgca	3720
cgcttaaaaa	taataaaaag	agacttgacc	tgatagtttg	gctgtgagca	attatgtgct	3780
tagtgcatct	aaogcttgag	ttaagccgcg	ccgcgaagcg	gmgctgggtt	gaacgaattg	3840
ttagacatta	tttgccgaact	accttggtga	tctogccctt	cacgtagtgg	acaaattctt	3900
ccaaotgato	tgccgcgcgag	gccaagcgat	cttctctctg	tccaagataa	gcctgtctag	3960
cttcaagtat	gaogggctga	tactgggccc	gcaggcgctc	cattgcccag	tccgcagcga	4020
catccttcgg	cgogattttg	ccggttactg	cgctgtacca	aatgcggggc	aaogtaagca	4080
ctacatttcg	ctcatcgcca	gccagtcggg	gcggcgagtt	ccatagcgtt	aagggttcat	4140
ttagcgcctc	aaatagatcc	tgttcaggaa	ccggatcaaa	gagttccctc	gcgcctggac	4200
ctaccaaggc	aaogctatgt	tctcttgcct	ttgtcagcaa	gahagccaga	tcaatgtoga	4260
togtggctgg	ctcgaagata	cctgcaagaa	tgtcattgcg	ctgccattct	ccaaattgca	4320
gttcagocgt	agctggataa	cgccaogga	tgatctgttc	gtgcacacaa	atggtgactt	4380
cttcagcgcg	gagaattctg	ctctctccag	gggaagccga	agtttccaaa	agttcgttga	4440
tcaaagctcg	ccgcgttgtt	tcatacaagc	ttacgggtcac	cgtaaccagc	aaatcaatat	4500
caactgtgtg	cttcaggccg	ccatccactg	cggagccgta	caaatgtacg	gccagcaacg	4560
tgggttcgag	atggcgctcg	atgaogccaa	ctacctctga	tagttgagtc	gatacttcgg	4620
cgatcaccgc	ttccctcatg	atgtttaact	ttgttttagg	gcgaotgccc	tgtgcgtaa	4680
catogttgct	gctccataac	atcaaacatc	gaocccaggg	gtaacgcgct	tgtgtgcttg	4740
atgcccaggg	catagactgt	acccccaaaa	aacagtcata	acaaagccatg	aaaaacogcca	4800
ctgcgcgctt	accacogctg	cgttcgggtca	aggttctgga	ccagttgcgt	gagcgcatac	4860
gctacttgca	ttacagotta	cgaaccgaac	aggcttatgt	ccactgggtt	cgtgccttca	4920
tccgtttcca	cggtgtgcgt	caccgcgcaa	ccttgggcag	cagcgaagtc	gaggcatttc	4980
tgtcctggct	ggcgaacgag	cgcaaggttt	cggtctccac	gcactcgtcag	gcattggcgg	5040
ccttgcctgt	cttctacggc	aaggtgctgt	gcaoggatct	gccttggttt	caggagatcg	5100
gaagacotcg	ggcgtgcggg	cgcttgccgg	tgtgtcgtac	cccggatgaa	gtggttcgca	5160
tctcgggttt	tctggaaggg	gagcatcgtt	tgttgcgcca	gottctgcat	ggaacgggca	5220
tgcggtacag	tgagggtttg	caactgcggg	tcaaggatct	ggatttcgat	caoggaacga	5280
tcactcgtcg	ggcgggcaag	ggctccaagg	atcgggcctt	gatgttaacc	gagagcttgg	5340
caccagcctt	gcgcgagcag	gggaattgat	cgggtggatg	accttttgaa	tgacctttaa	5400
tagattatat	taactaattaa	ttgggaaccc	tagaggtccc	cttttttatt	ttaaaaattt	5460
tttcacaaaa	cggtttacaa	gcataacggg	ttttgctgcc	cgcaaacggg	ctgttctggt	5520
gttgctagtt	tgttatcaga	atcgcagatc	cggcttcagg	tttgccggct	gaaagcgcta	5580
tttcttccag	aattgcctatg	attttttccc	caogggaggc	gtcactggct	cccggtgtgt	5640

```

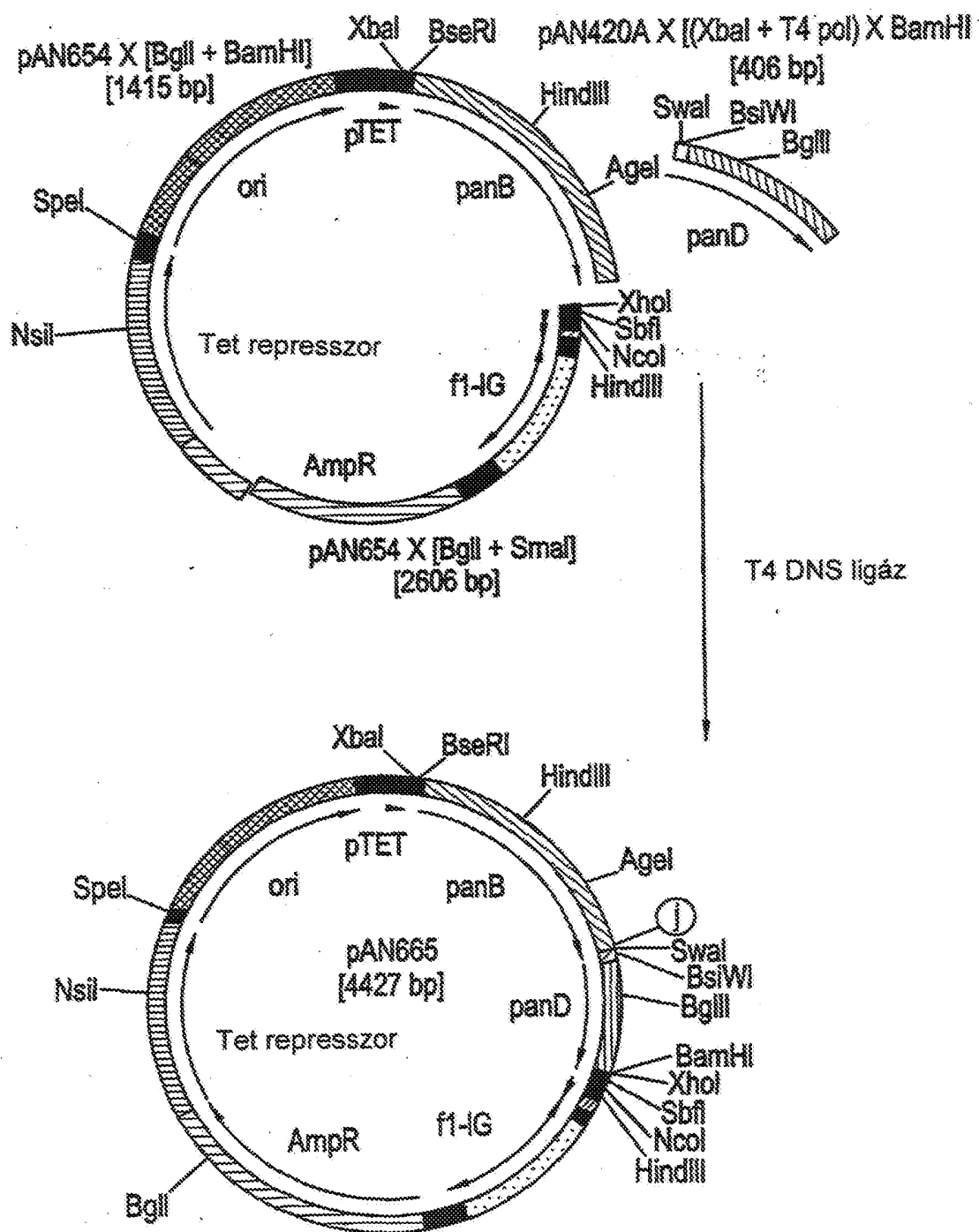
oggcagcttt gattcgataa gcagcatcgc ctgtttcagg ctgtotatgt gtgactgttg 5700
agctgttaaca agttgtctca ggtgttcaat ttcattgtct agttgctttg ttttactggt 5760
ttcacctggt ctattaggtg ttacatgctg ttcattctgt acattgtoga tctgttcatg 5820
gtgaacagct ttaaatgcac caaaaactcg taaaagctct gatgtatcta tcttttttac 5880
accgttttca tctgtgcata tggacagttt tccctttgat atctaacggg gascagttgt 5940
tctacttttg tttgttagtc ttgatgcttc actgatagat acaagagcca taagaacctc 6000
agatcccttc gtatttagcc agtatgttct ctagtgtggt tggttgtttt tgggtgagcc 6060
atgagaacga accattgaga tcatgcttac tttgcattgt actcaaaaat tttgctcaca 6120
aactggtgag ctgaattttt gcagttaaaag catogtgtag tgtttttctt agtcogttac 6180
gtaggtagga atctgatgta atggttgttg gtattttgtc accattcatt tttatctggt 6240
tghhctcaag ttoggttaag agatccattt gtctatctag ttcaacttgg aaaatcaacg 6300
taccagtogg ggggcctcgc ttarcaaaca ccaatttcat attgctgtaa gtgtttaaat 6360
ctttacttat tggtttcaaa accatttggg taagcctttt aaactcatgg tagttatttt 6420
caagcattta catgaactta aattcatcaa ggctaacttc tatatttgc ttgtgagttt 6480
tcttttgtgt tagttctttt aataaccact caataatcct catagagtat ttgttttcaa 6540
aagacttaac atgttccaga ttatatttta tgaatttttt taactggaaa agataaggca 6600
atatctcttc actaaaaact aattctaatt tttcgcttga gaacttggca tagtttgttc 6660
actggaaaat ctcaaaagct ttaaccaaag gattcctgat ttccacagtt ctogtcatca 6720
gctctctggg tgccttagct aatacaccat aagcattttc cctactgatg ttcatcatct 6780
gagcgtattg gttataagtg aacgatacgg tcogttcttt ccttgtaggg ttttcaatcg 6840
tggggttgag tagtgccaca cagcataaaa tttagcttgg ttcatgctcc gtttaagtcac 6900
agcgactaat cgctagtcca tttgctttga aaacaactaa ttcagacata catctcaatt 6960
ggtctagggt attttaatca ctataccaat tgagatgggc tagtcaatga taattactag 7020
tctttttctt ttgagttgtg ggtatctgta aattctgcta gacctttgct ggaaaaactt 7080
taaattctgc tagacctct gtaaatccg ctagaccttt gtgtgttttt tttgtttata 7140
ttcaagtggg tataatttat agaataaaga aagaataaaa aaagataaaa agaatagata 7200
ccagccctgt gtataactca ctactttagt cagtcccgca gtattacaaa aggatgtcgc 7260
aaacgctgtt tgctcctcta caaaaacagac cttaaaaacc taaaggotta agtagcaacc 7320
tcgcaagctc gggcaaatcg ctgaatattc cttttgtctc cgaccatcag gcacctgagt 7380
cgctgtcttt ttogtgacat tcagttogct gcgctcacgg ctctggcagt gaatgggggt 7440
aaatggcact acaggcgctt tttatggatt catgcaagga aactaccat aatacaagaa 7500
aagcccgta cgggcttctc agggcgtttt atggcgggtc tgcctatgtg tgcctatctg 7560
ctttttgtgt ttcaagagtt cctgcctctc gattttccag tctgaccaot tgggattatc 7620
ccgtgacagg tcaattcagac tggctaattg acccagtaag gcagcggtat catcaacagg 7680
cttaccgctc ttactgtcaa c 7701

```

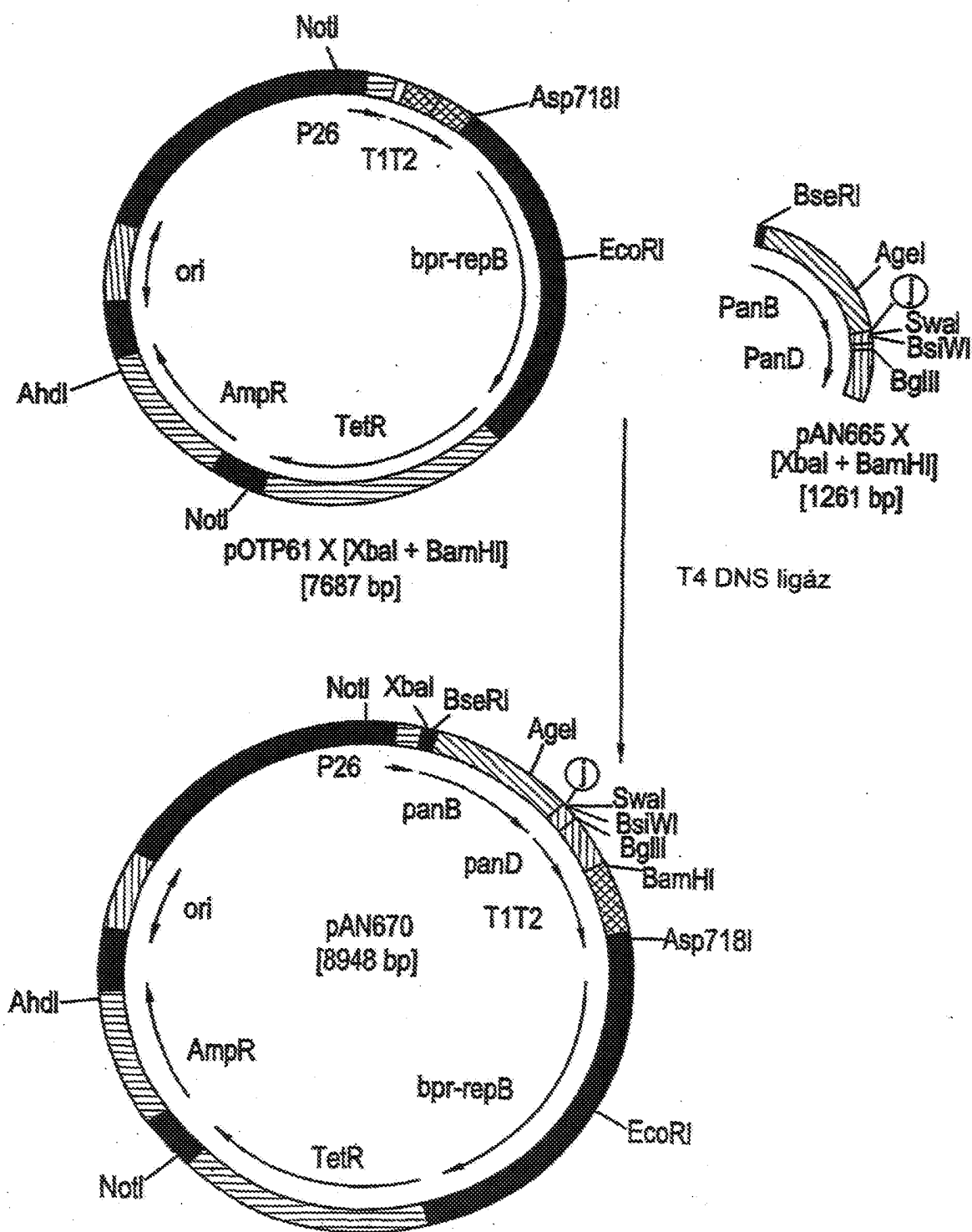

2. ÁBRA



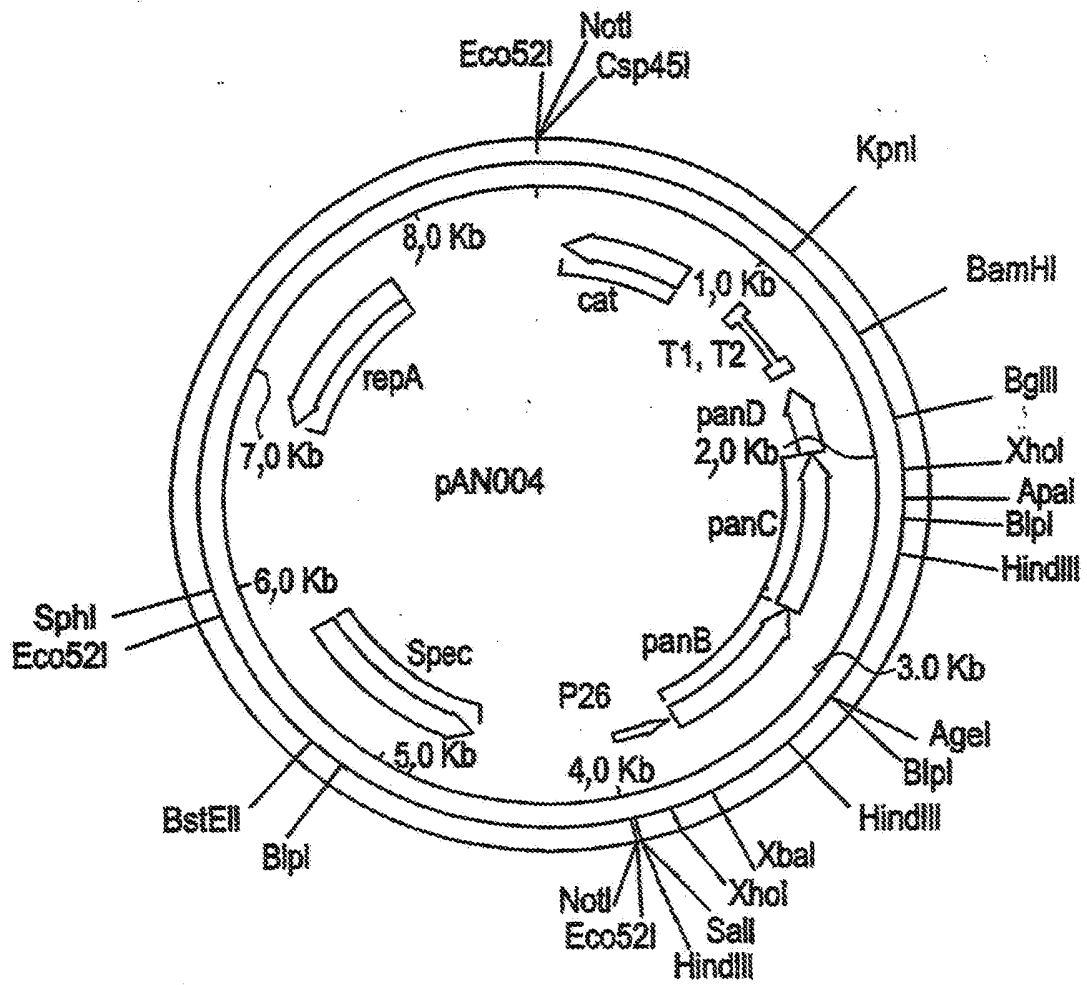
3. ÁBRA



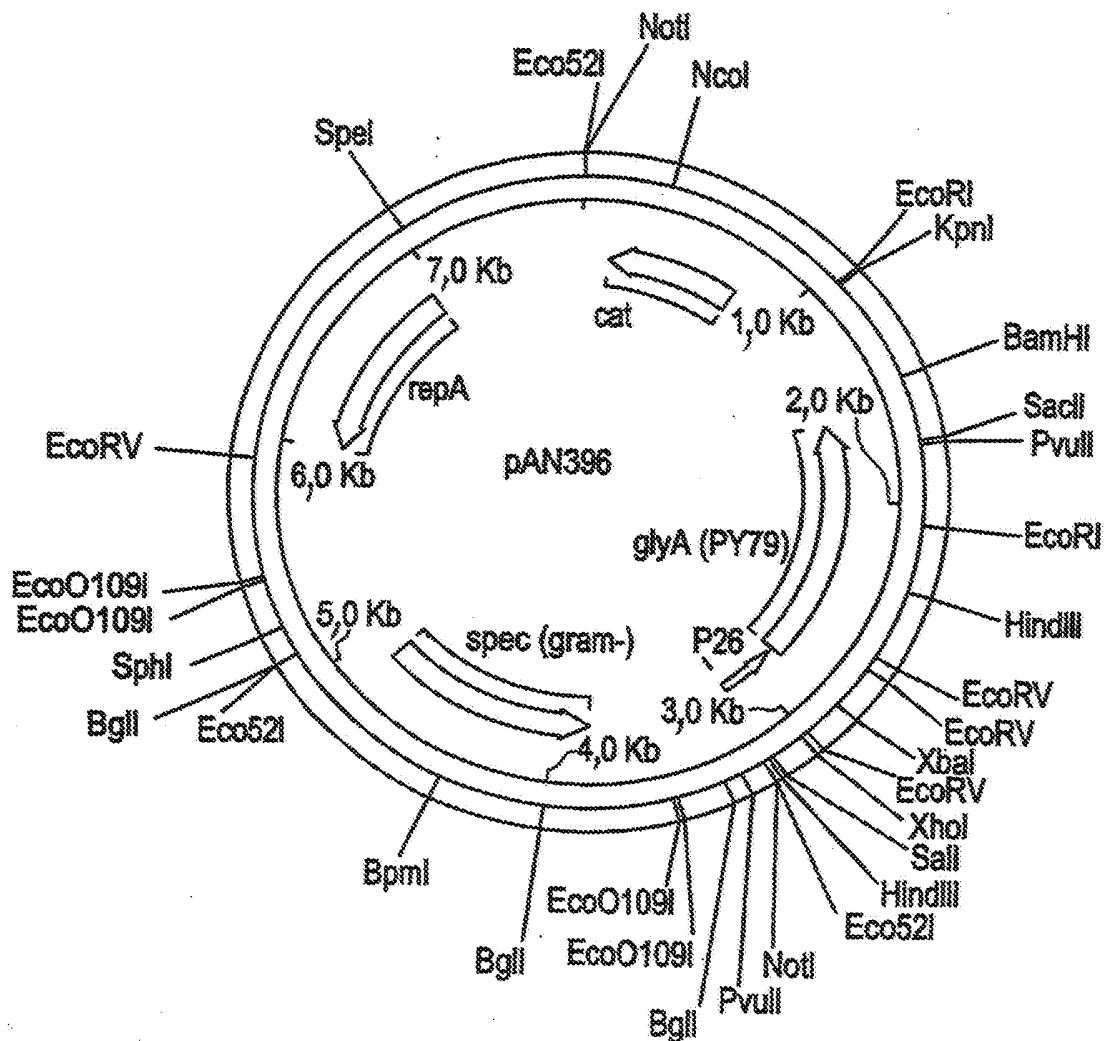
4. ÁBRA



5. ÁBRA



6. ÁBRA



7. ÁBRA

