



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

217 410 B

(21) A bejelentés ügyszáma: P 95 00139
(22) A bejelentés napja: 1994. 05. 18.
(23) Módosítási elsőbbség: 1994. 07. 01.
(30) Elsőbbségi adatok:
93/06003 1993. 05. 18. FR
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/FR 94/00589
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 94/26879

(51) Int. Cl.⁷

C 12 N 9/04
C 12 N 15/53
C 12 G 1/02
C 12 N 1/18

(40) A közzététel napja: 1996. 03. 28.
(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2000. 01. 28.

(72) Feltalálók:

Ansanay, Virginie, Montpellier (FR)
Barre, Pierre, Saint-Gely-du-Fesc (FR)
Dequin, Sylvie, Montpellier (FR)

(73) Szabadalmas:

Institut National de la Recherche Agronomique
(INRA), Párizs (FR)

(74) Képviselő:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,
Budapest

(54)

A *Lactococcus lactis* malolaktikus enzimének génje, a génnel transzformált gazdasejtek és eljárás malolaktikus fermentálásra a transzformált gazdasejtek alkalmazásával

KIVONAT

A találmány tárgya a *Lactococcus lactis* malolaktikus enzime struktúrgénjének klónozásával kapcsolatos.

A találmány tárgyát közelebbről a gén teljes nukleotidszekvenciája, az abból levezethető aminosavszekvencia, valamint olyan DNS-fragmensek képezik, melyek a gént kódoló szekvenciát tartalmazzák. A találmány tárgyát képezik továbbá a találmány szerinti gént tartalmazó nukleinsavmolekulákkal transzformált gaz-

dasejtek, különösen *Saccharomyces* és *Schizosaccharomyces* gazdasejtek.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy eljárás malolaktikus fermentáció végrehajtására, a találmány szerinti gazdasejtek alkalmazásával.

A találmány szerinti megoldás alkalmas borok savtartalmának csökkentésére és mikrobiológiai stabilizálására.

HU 217 410 B

A találmány tárgya a *Lactococcus lactis*-ban található malolaktikus enzim struktúrgénjének klónozásával kapcsolatos.

A találmány tárgyát közelebbről a gén teljes nukleotidszekvenciája, az abból levezethető aminosavszekvencia, valamint olyan DNS-fragmensek képezik, melyek a gént kódoló szekvenciát tartalmazzák. A találmány tárgyát képezik továbbá a találmány szerinti gént tartalmazó nukleinsavmolekulákkal transzformált gazdasejtek, különösen *Saccharomyces* és *Schizosaccharomyces* gazdasejtek.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy eljárás a találmány szerinti gazdasejtek alkalmazásával malolaktikus fermentáció végrehajtására.

A találmány szerinti megoldás előnyösen alkalmazható borok savtartalmának csökkentésére és mikrobiológiai stabilizálására.

A malolaktikus fermentáció, mely a borkészítés során az élesztők által végbemenő alkoholos erjedés mellett másodlagos fermentációs folyamatként figyelhető meg, a borokban található almasav bizonyos tejsavbaktériumok általi tejsavvá és CO₂-dá való bontását jelenti. Baktériumfajok természetesen előfordulnak a fermentációs flórában, melyek közül a malolaktikus fermentációért a *Lactobacillus*, a *Leuconostoc* és a *Pediococcus* nemzetség felelős.

A reakciónak két fő előnye van:

- a bor savtartalmának csökkenéséhez vezet a dikarbonsav (L-malát) monokarbonsavvá (L-laktát) történő átalakításával, mely organoleptikus szinten jelent előnyt a vörösborok többségénél és néhány fehérbor esetében, és
- lehetővé teszi a bor mikrobiológiai stabilizálását, ennek következtében a jobb tartósítást egy olyan fermentálható szubsztrát felhasználásával, mely megakadályozza a nemkívánatos baktériumtörzsek általi további erjedést. Végül a malolaktikus fermentáció kedvezően befolyásolhatja a borok minőségét annak aromája szempontjából.

Problémákat jelenthet azonban a reakció lassúsága és szabályozatlansága.

A spontán malolaktikus fermentáció a borkészítés folyamatának csak a végén zajlik le, a borban a pH, az etanoltartalom és a kén-dioxid jelentősen lelassítják a tejsavbaktériumok növekedését, melyek természetesen fordulnak elő a bor fermentációja során, és melyek felelősek a malolaktikus fermentációért. Ennek a fermentációs folyamatnak a felgyorsítása érdekében a legáltalánosabban alkalmazott módszer az, hogy a fermentációs oldatot tejsavbaktériumokkal beoltják.

A tejsavbaktériumok elszaporításának problémájára azonban ez a technika sem jelent minden esetben megoldást, mivel a tejsavbaktériumok nehezen alkalmazkodnak a borhoz mint tápoldathoz.

Továbbá a tejsavbaktériumok bevitelét az is jelenti, hogy a kívánatos enzimaktivitáson kívül számos olyan enzimet is viszünk a borba, melyek a borban található szubsztrátokkal reakcióba lépve a termékben olyan érzékszervi úton észlelhető minőségi tulajdonságok kifejlődéséhez vezethetnek, melyek kialakulása nehezen szabályozható.

Kívánatos lenne ezért, ha rendelkeznénk a malolaktikus fermentáció egy olyan lehetséges megvalósítási módjával, mellyel a kapott termék gyors javulását lehetne elérni, miközben a nem kívánt szabályozhatatlan faktorok kiküszöbölhetővé válnának.

- 5 A malolaktikus fermentáció jobb szabályozása céljából javasolták a tejsavbaktériumok malolaktikus enzimét kódoló gén klónozását, beépítését és expresszáltatását olyan mikroorganizmusban, mely normálisan is jelen van a bor előállításánál, mint például a *S. cerevisiae*.

- 10 Williams és munkatársai [App. Environ. Microbiol. 47, 288 (1984)] – valamint a 103399 számú európai közrebecsítási irat – leírják egy olyan 5 kb DNS-fragmens *S. cerevisiae*-ben és *E. coli*-ban történő klónozását, mely a *L. delbrueckii* malolaktikus enzimének génjét hordozza.

- 15 A *L. oenos* malolaktikus enzimét kódoló gént is klónozták *E. coli*-ban [Lautenach és munkatársai: Microbiol. 39, 29 (1984)].

A transzformált mikroorganizmusok azonban a gént olyan alacsony szinten expresszálják, hogy nem alkalmasak bor gyártásában történő felhasználásra.

- 20 Ezenfelül mindkét esetben az *E. coli*-ban klónozott DNS instabilitását figyelték meg, mely akár közel a teljes gén elvesztését is jelentheti.

- 25 Továbbá, legújabban egy *Lactococcus lactis*-ből származó malolaktikus enzimet tisztítottak meg, melynek enzimaktivitása összevethető mértékű a fent említett *Leuconostoc*, *Pediococcus* és *Lactobacillus* nemzetségekből származó enzimével. Ez egy olyan 230 kD molekulatömegű fehérje, mely 56 kD méretű alegységekből áll. A pI-je 4,3 körüli érték, az almasavra vonatkozó Km-érték pedig 10–12 mmol/l. Az N-terminális szekvenciáját is meghatározták [Renault: „Malolactic fermentation: Genetics and Genetic Engineering, GIM90, 6th Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms”, Strasbourg (1990)].

- 30 A tisztított preparátum felhasználásával az enzimmel specifikusan reagáló ellenanyagot állítottunk elő. Ezt követően a *Lactococcus lactis* DNS-könyvtárát készítettük λgt11-vektorban, *E. coli*-ban. Ennek a könyvtárnak a kapott ellenanyaggal történő szűrése lehetővé tette, hogy olyan DNS-fragmenseket klónozzunk, melyek a *Lactococcus lactis* genomiális DNS-ének egy 4,5 kb hosszúságú, a malolaktikus gént és a malát permeáz génjének egy fragmensét tartalmazó régióját reprezentálták. Az említett gének egy operonba vannak rendeződve. Azonosítottunk egy 2684 bp hosszúságú DNS-fragmenst, mely a malolaktikus enzim teljes génjét tartalmazza, a fragmens szekvenciáját meghatároztuk, a szekvencia a szekvencialistában az 1. szekvenciaazonosító számon szerepel. Továbbá a malolaktikus enzim génjét különböző prokarióta és eukarióta gazdaszervezetekben expresszáltattuk. Ennek során megvalósítottuk a *Lactococcus lactis* malolaktikus génjének *E. coli*-ba történő beépítését a saját szabályozóelemeinek irányítása alatt, valamint az említett gén élesztőbe történő beépítését az élesztő szabályozóelemeinek irányítása alatt.

A találmány tárgyát képezi egy nukleinsavfragens, amely a *Lactococcus lactis* malolaktikus enzim génjének szekvenciáját tartalmazza.

A „*Lactococcus lactis* malolaktikus génjének szekvenciája” alatt pontosan az a szekvenciaazonosító számon szereplő szekvencia 466.-tól a 2085. nukleotidjáig terjed, valamint bármilyen szekvencia, mely a genetikai kód degenerált változataként ugyanazt a polipeptidet kódolja, továbbá a definíció kiterjed azokra a szekvenciákra, melyek kisebb módosításokat hordoznak annak érdekében, hogy egy adott gazdaszervezet esetében jobb expressziót tegyünk lehetővé.

A találmány tárgyát képezik továbbá a fent definiált *Lactococcus lactis* malolaktikus gén szekvenciájával homológ vagy komplementer szekvenciákat tartalmazó nukleinsavfragszékcsék, valamint ezek legalább 10, előnyösen legalább 20 nukleotidból álló fragszékcséi, melyek az említett gén detektálására alkalmas hibridizációs próbaként és/vagy amplifikációs lánccindító molekulaként alkalmazhatók.

A találmány tárgyát képezik a *Lactococcus lactis* malolaktikus enzim génjének szekvenciáját tartalmazó expressziós egységek is, melyek az illető gén expresszióját szabályozni képes szekvenciák vezérlése alatt állnak.

A „gén expresszióját reguláló gén” alatt azok a promotor és terminátor típusú szekvenciák értendők, melyek abban a gazdaszervezetben fejtik ki hatásukat, melyben a gén expresszióját kívánjuk elérni. A különböző gének promoterei és terminátorai különböző variációkban összekapcsolva is alkalmazhatók.

Élesztők esetében a *Lactococcus lactis* malolaktikus enzim génjének expressziója során alkalmazható szekvenciák közül anélkül, hogy igényünket az ismertett példákra korlátoznánk, megemlíthetők az önmagukban ismert alkohol dehidrogenáz I (ADHI) foszfoglicerol kináz (PGK) és a glicerinaldahid-3-foszfat dehidrogenáz (GAPDH) gének promoterei és terminátorszekvenciái.

A találmány szerinti expressziós egységeket hordozhatják plazmidok, vagy beépülhetnek a gazdaélesztő kromoszomális DNS-ébe.

A találmány tárgyát képezik továbbá olyan rekombináns vektorok, melyek legalább egy olyan DNS-fragmenst tartalmaznak, mely a *Lactococcus lactis* malolaktikus enzim génjének szekvenciáját tartalmazza, egy fent definiált értelemben.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint az említett vektorok olyan expressziós vektorok, melyek egy fent definiált expressziós egységet tartalmaznak.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint az említett vektorok olyan regulátorszekvenciákat tartalmaznak, melyek élesztőben aktívak.

A találmány szerinti vektorok előnyösen olyan ingázóvektorok, melyek egyaránt rendelkeznek bakteriális replikációs origóval, valamint szelekciós markerrel (például egy antibiotikum-rezisztenciagénnel).

A vektorok az expressziós egységbe épített regulátorelemek természete és erőssége szerint szelektálha-

tók. Kiválaszthatók a fent leírt promoterek és terminátorszekvenciák, illetve bármilyen más olyan szekvencia, mely lehetővé teszi élesztőben a gén expressziójának irányítását és szabályozását.

5 A vektorok kiválasztásának egy másik kritériuma a kópiaszám, melyet a replikációs origó megválasztása határoz meg.

Kiválaszthatjuk például a következő típusú vektorok valamelyikét:

10 – Nagy kópiaszámú replikálódó vektor (YEp), mely élesztő replikációs origóként az endogén 2 μ -plazmid egy részletét tartalmazza.

– Nagy kópiaszámú replikálódó vektor (YRp), mely replikációs origóként kromoszomális ARS-szekvenciát tartalmaz.

15 – Nagy kópiaszámú lineáris replikálódó vektor (YLP), mely replikációs origóként telomerszekvenciát tartalmaz.

20 – Kis kópiaszámú replikálódó vektor (YCp), mely kromoszomális ARS-szekvenciát és centromerszekvenciát tartalmaz.

A találmány szerinti vektorok előnyösen tartalmaznak élesztőben szelektálható markereket is, úgymint auxotrofiamarkereket: URA3, LEU2, HIS3, TRP1, ADE és hasonlók, és/vagy antibiotikumokkal (G418, higromicin B, kloramfenikol, fleomicin) szembeni, herbicidekkel (szulfometuron-metil) szembeni és rézzel szembeni rezisztenciamarkereket és hasonlókat.

25 A találmány szerinti vektorok, melyek a *Lactococcus lactis* malolaktikus enzim génjét hordozzák, bejuttathatók bármelyik élesztőtörzshe különböző transzformációs technikák alkalmazásával.

30 A legáltalánosabb alkalmazható technikák közül megemlíthető a protoplasztos eljárás, a lítiumsóval történő permeabilizálás és az elektroporáció.

A találmány szerinti gazdasejteket minden esetben a következő lépésekben alakítjuk ki:

35 – a malolaktikus enzim génjét és különböző erősségű szabályozóelemeket tartalmazó expressziós egység felépítése;

– az expressziós egység élesztőbe juttatása egy vagy több kópiában.

40 Azt a megoldást is választhatjuk, mely szerint a *Lactococcus lactis* malolaktikus enzimjét kódoló gént a saját szabályozószekvenciáival együtt bejuttatjuk az élesztő genomjába, mely esetben például egy élesztő replikációs origóval nem rendelkező integrálódó vektort (YIp) választhatunk; de integrálhatjuk a gént más technika alkalmazásával is, például kotranszformációval.

50 Lehetséges a *Lactococcus lactis* malolaktikus enzim kódoló gén expressziójának modulálása az élesztőbe bevitt génkópiák számának szabályozásával és/vagy a génhöz kapcsolt regulálóelemek erősségének változtatásával.

55 A találmány tárgyát képezik továbbá transzformált eukarióta és prokarióta sejtek, melyek legalább egy olyan heterológ DNS-fragmenst tartalmaznak, mely a *Lactococcus lactis* malolaktikus enzim génjének legalább egy kópiáját hordozza, a gén expresszióját az adott sejtben szabályozni képes szekvenciák vezérlése alatt.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint az említett sejtek élesztősejtek.

A találmány szerinti élesztősejtek az élelmiszeripar számos területén alkalmazhatók, különösképpen az oenológia területén, a malolaktikus fermentáció végrehajtására.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint az élesztősejtek a *Saccharmyces* nemzetséghez tartoznak.

A találmány egy másik előnyös megvalósítási módja szerint az élesztősejtek a *Schizosaccharomyces* nemzetséghez tartoznak.

A *Schizosaccharomyces* fajokat alkalmazzák az oenológiában, mivel képesek almasavat bontani. Ez az alkalmazási lehetőség azonban korlátozott, mivel a lebontási folyamat, melyet az almasavbontó enzim végez, nem tejsavat eredményez, hanem etanolt és CO₂-ot, ami jelentős savtartalom-csökkenést eredményez, és ez a bor sajátosságait kedvezőtlenül befolyásolhatja.

A találmány szerinti, malolaktikus enzimet kódoló gént expresszáló *Schizosaccharomyces* törzsek olyan malolaktikus fermentációt folytatnak, melynek során az L-malát L-laktáttá alakul, ami azzal az előnnyel jár, hogy sokkal kisebb mértékben csökken a savtartalom, mint a malát/etanol átalakulás esetén.

A találmány szerinti *Schizosaccharomyces* törzsek számos területen alkalmazhatók az oenológiában; alkalmazhatók például:

- együtt tenyésztve a *Sacchariomyces cerevisiae* oenológiában alkalmazott törzseivel;
- immobilizált mikroorganizmusként.

A találmány szerinti megoldás még világosabban érthetővé fog válni a leírás további része alapján, melyben olyan kísérleti példákat mutatunk be, melyekben feltárjuk a *Lactococcus lactis* malolaktikus enzim génjének klónozását, valamint baktériumokban és élesztőkben történő expresszióját.

Általános módszerek

A malolaktikus enzim tisztítását Renault [már idézett publikációja (1990)] és C. Roulland [„DEA in oenology-ampelography”, University of Bordeaux II (1988. szeptember)] módszere szerint végeztük.

A genetikai manipuláció és a molekuláris klónozás általános módszereit, melyekre az alábbi példákban hivatkozunk, Sambrook és munkatársai leírása szerint végeztük [„Molecular Cloning: A Laboratory Manual” (második kiadás), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. (1989)].

1. példa

A malolaktikus enzim tisztítása

Az alábbiakban röviden ismertetjük az extrakciós eljárást:

Törzstenyésztési körülmények

A *Lactococcus lactis* (IL 1441) törzset az alábbi tápoldatban tenyésztjük:

élesztőkivonat	6 g
tripton	2 g
glükóz	15 g
DL-almasav	15 g

K ₂ HPO	40,5 g
KH ₂ PO	40,5 g
MgSO	40,4 g
NaCl	0,02 g
5 FeSO ₄	0,004 g
MnSO ₄	0,02 g
H ₂ O ad	1 l

A pH-t 5-re állítjuk. A steril tápoldatot 10% (térfogat%) előtenyésztéssel oltjuk be.

10 A nyers extraktum előállítás és vizsgálata

A sejteket a fenti tápoldat 3 l-ében 28 °C-on 24 órán át szaporítjuk, 10 percig, 1000 g-vel történő centrifugálással begyűjtjük, majd kétszer mossuk 0,9%-os NaCl-dal.

Az üledéket 30 ml foszfát pufferben (0,1 mol/l, pH=6,0) vesszük fel. A sejteket ultrahanggal 6 percig 0 °C-on tárjuk fel. Centrifugálás után (30 000 g, 15 perc, 4 °C) a felülúszó képezi a nyers extraktumot.

A fehérjekoncentrációt „BCA protein assay reagent” (Pierce) alkalmazásával határozzuk meg.

20 A malolaktikus enzim aktivitását CO₂-elektród (Eischweiler) segítségével mérjük az almasav dekarboxilezése alapján.

Az enzim tisztítása

25 DN-áz-I-enzimes kezelés után (1 mg/ml, 15 perc, szobahőmérsékleten) a nyers extraktumot ammónium-szulfátos kicsapás alkalmazásával frakcionáljuk (35%-os, majd 70%-os telítés).

30 A 70%-os kicsapásnál a felülúszó nem tartalmaz enzimaktivitást. Az üledéket, mely az összes malolaktikus enzimaktivitást tartalmazza 2 ml 0,1 mol/l-es foszfát pufferben vesszük fel (pH=6,0), AcA 34 töltetet tartalmazó géliszűrő oszlopra visszük (Ultrogel; frakcionálási tartomány 20 000 D-től 350 000 D-ig), mely 40 cm hosszú és 2,6 cm az átmérője. Az oszlopot előzetesen az elúciós pufferrel ekvilibráljuk: 0,01 mol/l foszfát puffer, pH=6,0; 0,1 mol/l KCl. Az elúciót 18 ml/óra térfogatárammal végezzük, 2,4 ml-es frakciókat gyűjtünk.

40 Ilyen körülmények között a legtöbb aktivitást az 50–54. frakciók tartalmazzák, melyeket a továbbiakban izoelektro-fokuszálással tisztítunk.

45 Az izoelektro-fokuszálást 110 ml-es LKB oszlopon végezzük. A gradienst 2%-ban alkalmazott amfolin pufferek segítségével alakítjuk ki, és glicerin sűrűség gradienssel stabilizáljuk, melyet az oszlop töltésekor alakítunk ki. A legaktívabb frakciót, mely pH=3-nál, a fehérje pI-jénél gyűlik össze, kinyerjük, és egy további lépésben ioncserés kromatográfiával (Sephacrose Q anioncserélő oszlop Pharmacia) tisztítjuk.

50 Az elúciót 0-tól 0,5 mol/l NaCl-ot tartalmazó 50 mmol/l-es TRIS-HCl pufferrel pH=7,6 végezzük, melyben még EDTA és 1 mmol/l β-merkaptó-etanol is található.

A malolaktikus aktivitást tartalmazó frakció 0,33 mol/l NaCl-koncentrációnál eluálható. Ez az a frakció, melyet ellenanyag előállítására alkalmazunk.

2. példa

A *Lactococcus lactis* malolaktikus enzimére specifikus poliklonális ellenanyag előállítás

60 Az ellenanyagokat a tisztított preparátum két nyúlba történő beoltásával kapjuk a következő eljárás szerint:

– A malolaktikus fehérje 2 ml-nyi oldatát (100 µg 0,3 mol/l NaCl-pufferben) teljes Freund-adjuvánszal ki-
egészítve bőr alá oltjuk.

– A második injekciót 40 nappal később adjuk be, ugyanolyan mennyiségű malolaktikus proteinnel és 2 ml inkomplett Freund-adjuvánszal.

A két nyúl vérét 18 nappal a 2. injekció után le-
vesszük, majd 24 órán át 4 °C-on hagyjuk koagulálni, ezt követően 10 000 g-vel 10 percig 4 °C-on centrifugáljuk, majd a kapott szérumot –20 °C-onalíkvotokba osztva tároljuk.

A malolaktikus enzimre specifikus ellenanyagokat ELISA-teszt alkalmazásával vizsgáljuk mindkét szérum esetében (jelölésük: 120 és 119), melyeket a nyúl-szérumból Sambrook és munkatársai (1989) által leírt eljárással nyerünk. Ez az analízis tette lehetővé, hogy meghatározzuk az ellenanyag felhasználásához szükséges optimális hígítást, mely 1000-szeresnek bizonyult.

Az ellenanyagok, specifikusát immunoelektroforetikus transzfer eljárással („Western blot”) határoztuk meg.

Egyfelől a *Lactococcus lactis* nyers extraktumának fehérjéit (melynek készítését az első példában írtuk le), másfelől a malolaktikus enzim tisztított preparátumának fehérjéit SDS-PAGE-elektroforézissel elválasztjuk, majd nitrocellulóz membránra visszük át.

Ezt követően a kapott poliklonális ellenanyagokat a membránra visszük és alkalikus foszfatázzal jelzett anti-nyúl-ellenanyaggal hívjuk elő.

A 120-as szérum mind a nyers extraktumból, mind a tisztított frakcióból egy körülbelül 60 kD móltömegű domináns csíkot és néhány alacsony móltömegű szennyező anyaghoz tartozó csíkot ismer fel.

Másfelől a 119-es szérum mind a tisztított frakcióból, mind a nyers extraktumból egyetlen csíkot ismer fel, mely a malolaktikus enzimhez tartozik. Ennek értelmében ezt a nagy specifitású szérumot alkalmazzuk a további kísérletekben.

3. példa

A Lactococcus lactis genomiális DNS-ének expressziójához szükséges génekönyvtár létrehozása E. coliban.

a) *A Lactococcus lactis DNS-ének extrakciója*

A *Lactococcus lactis* genomiális DNS-könyvtárt a λgt11-vektorban alakítottuk ki.

A *Lactococcus lactis* IL1441 genomiális DNS-ét első lépésként extraháltuk és tisztítottuk. Ennek érdekében az exponenciális fázisban levő tenyészetből 500 ml-t 5000 g-vel 10 percig centrifugáltunk. A csapadékot 5 ml TE-ben (10 mmol/l TRIS, 1 mmol/l EDTA, pH=8) vesszük fel, és 10 percig 37 °C-on inkubáljuk. Ezután 1 ml, 0,1 mol/l, pH=8 EDTA-ban oldott 25%-os SDS-t adunk hozzá, majd a keveréket 15 percig 60 °C-on inkubáljuk. A DNS-t előbb kétszeri fenol-kloroformos, majd kétszeri kloroform-isoamil-alkoholos (24:1) extrakcióval tisztítjuk. A végső tisztítást cézium-klorid gradienssel ethidium-bromid jelenlétében végezzük. Az ethidium-bromidot izoamil-alkohollal extraháljuk. Kétszeres térfogatú, vízzel történő hígítás után 6-szoros térfogatú etanolos hígítással kicsapjuk a DNS-t. A csapadékot egy pálcá segítségével nyerjük ki, és 1 ml TE-ben

oldjuk. Az oldott DNS koncentrációját (1 µg/µl) a 260 nm-en mért OD alapján határoztuk meg.

b) *A Lactococcus lactis DNS emésztése*

125 µg *Lactococcus lactis* DNS-t részlegesen emésztünk két egység AluI- és két egység HaeIII-enzimmal 35 percig 37 °C-on annak érdekében, hogy tompa végeket kapjunk. Az emésztést 0,1 mol/l végkoncentrációban alkalmazott EDTA hozzáadásával állítjuk le.

Az emésztett DNS-t 1/20 térfogat 3 mol/l-es nátrium-acetáttal és 2 térfogat etanollal kicsapjuk. Centrifugálás után a DNS-t 300 µl TE-ben vesszük fel, majd a fragmenseket szukrozgradiensben szeparáljuk, 15 órán át 25 000 fordulatszámmal. A gradiensből 0,5 ml-es frakciókat szedünk, majd azokat 0,8%-os agaróz gélben analizáljuk. Az 1,5 és 4 kb fragmenseket tartalmazó frakciókat TE-vel szemben 4 órán át dializáljuk.

c) *Az emésztett DNS bevitele a λgt11-vektorba*

Az expressziós könyvtár elkészítéséhez a λgt11-vektort (amely a λ-bakteriofágból származik) választottuk ki. A könyvtár előállításának lényege, hogy a β-galaktoszidáz génjének 3'-végi régiójába DNS-fragmenseket építünk be azért, hogy a β3-galaktoszidáz-promoter szabályozása alatt álló hibrid fehérjét expresszáltassunk.

1 µg (tompá végű) DNS-t, melyet a fent említett módon emésztettünk és dializáltunk, kötöttünk a λgt11-vektorhoz a következő elv szerint:

A DNS-t defoszforilált adapterekhez kötjük, hogy egy tompa és egy EcoRI ragadós véget kapjunk. A szabad adapterek géliszűrő oszlopon történő eltávolítása után az adapterhez kötött DNS-fragmenseket foszforiláljuk, és egy, a vektor előzőleg szintén EcoRI-gyel emésztett és defoszforilált karjához kötjük.

A fág részecskéket ezután in vitro burkoljuk. Az így kapott könyvtárt *E. coli* 1090 [hSd (r–km+k) lac U169, ProA+, lon-, araDI39, StrA, SupF, trpC22: Tn10 (pMC9)] baktériumtörzseknek a megfelelő fáguszpenzióval történő fertőzésével titráltuk, és a transzformánsokat LB+ampicillin (50 µg/ml) táptalajon (baktotripton: 10 g/l, élesztőkivonat: 5 g/l, NaCl: 10 g/l) 43 °C-on (hogy a baktérium lízisét elősegítsük) szelektáltuk. A lizisplakkokat 4 órás inkubálás után kaptuk meg.

Az ily módon kapott könyvtár körülbelül 3-szorosan reprezentálja a *Lactococcus lactis* genomot.

4. példa

A genomiális DNS-könyvtár átvizsgálása

a) *A könyvtár lemezeken történő szélesztése, filterek készítése*

A könyvtár LB+ampicillin+MgCl₂ táptalajon történő szélesztése, és 3 óra 30 perces 43 °C-on történő inkubálása útján (nem expressziós körülmények) 75 000 lizisplakkot kaptunk. A lemezeket 10 mmol/l IPTG-vel átitatott nitrocellulóz filterekkel lefedtük, és 4 órán át 37 °C-on inkubáltuk az expresszió indukálása céljából.

A filtereket TNT-ben (10 mmol/l TRIS-HCl, pH=8, 150 mmol/l NaCl, 0,05% Tween 20) áztatjuk, majd 30 percig szobahőmérsékleten óvatos kevertetés közben inkubáljuk ugyanazon pufferben.

A klónok kiválasztásánál a hamis pozitív eredmények elkerülése érdekében, melyet a könyvtár átvizsgálásakor a nem specifikusan hibridizálódott klónok adnak, egy másik sorozat filtert – az első sorozat másolatait – helyeztük a lemezekre, és az előzővel azonos módon inkubáltuk és kezeltük.

b) A 119-es szérum kimerítése

A könyvtár immunológiai szűrését a 119-es szérummal végezzük, melyet előzetesen az *E. coli* fehérjével szemben merítünk ki. A szérum kimerítését a következőképpen végezzük:

Az Y1090 *E. coli* törzset 100 ml LB + ampicillin táptalajon tenyésztjük 24 órán át 37 °C-on. A tenyészetet 5000 g-vel 10 percig 4 °C-on centrifugáljuk. A csapadékot 3 ml pufferben vesszük fel (50 mmol/l TRIS, 10 mmol/l EDTA, pH=8), majd a szuszpenziót lefagyaszttjuk –20 °C-on, majd felolvasztjuk, és ezt néhányszor megismételjük. A sejteket 0 °C-on, ultrahanggal tökéletesen lizáljuk (6×20 mp), majd 12 000 g-vel 10 percig 4 °C-on centrifugáljuk. A lizátumot kinyerjük, majd 4 órán át szobahőmérsékleten inkubáljuk 1 ml 10-szeres hígítású 119-es ellenanyag jelenlétében, TNT pufferben +1% zselatin +3% BSA +5% sovány (*skim*) tejporban.

A kimerített szérumot 4 °C-os 0,05% nátrium-azid hozzáadásával tároljuk.

c) A könyvtár immunológiai szűrővizsgálata

A nitrocellulóz filtereket ezután a 119-es szérummal inkubáljuk, és a kötött ellenanyagot alkalikus foszfátzsal jelzett anti-nyúl-ellenanyag segítségével hívjuk elő, amint azt a korábbiakban leírtuk.

Csak azokat a klónokat vesszük figyelembe, melyek esetében mindkét filteren pozitív jelet kapunk. Ennek alapján 24 pozitív klónt választottunk ki.

Annak érdekében, hogy a kapott jel specificitását megerősítsük, a pozitív klónokból szubklónokat hozunk létre, és azokat is ellenanyaggal történő vizsgálatnak vetjük alá. A pozitív lízisplakkok körüli gyűrűt eltávolítjuk, majd 500 µl SM pufferben (NaCl 6 g/l, MgSO₄·7H₂O 2 g/l, TRIS bázis 6 g/l, zselatin 0,01%, pH=7,5) inkubáljuk 2 órán át 4 °C-on, annak érdekében, hogy a gyűrűkből a fágreszecskek kidiffundálhassanak. Ezzel a szuszpenzióval ismét megfertőzzük az *E. coli* 1090-et, majd a keveréket LB+ampicillin+MgCl₂ lemezekre szélesztjük az előzőekkel azonos módon azért, hogy jól elkülönült lízisplakkokat kapjunk. A 119-es szérummal történő második szűrővizsgálat az ellenőrzött 24 klónból 14 klón elhagyását tette lehetővé, melyek már nem mutattak egyértelmű jelet. A többi 10 klónt, melyek tisztán pozitívak voltak, kiválasztottuk.

d) A rekombináns klónok jellemzése

A 10 pozitív klónból származó fág DNS-t extraháltuk és analizáltuk. A jól elkülönült lízisplakk (szubklón) szolgált rendszeresen kiindulási anyagként.

ATG(A,C)G(G,A,T,C)GC(G,A,T,C)CA(T,C,)GA(G,A)AT.

Az azonos DNS-fragmensekből származó 5 inszert hibridizálódott a hibridizációs próbával, ami azt bizonyítja, hogy a *Lactococcus lactis* malolaktikus enzimet

AZ LB+ampicillin lemezekről származó egyesített plakkokból a DNS-t extraháljuk. A lemezeket 5 ml SM-pufferrel lefedjük, majd 4 °C-on 2 órán át kevertetjük. A kapott szuszpenzióhoz néhány csepp kloroformot adunk, majd 4000 g-vel 10 percig 4 °C-on centrifugáljuk, hogy a bakteriális sejtörmelékelt eltávolítsuk. A fág szuszpenzióból extraháljuk a DNS-t, miáltal azt tisztítjuk is.

Az analízis első lépése a rekombináns fágok inszertjeinek PCR-amplifikációja, méretük meghatározása céljából.

Két oligonukleotidot [λ gt11 láncindító (előre) 24 tagból álló oligomer és a λ gt11 láncindító (vissza) 24 tagból álló oligomer, Biolabs], melyek az EcoRI klónozóhelyet körülvevő β -galaktozidáz-szekvenciáknak felelnek meg, használtunk az inszertek amolifikálásához láncindítóként.

Az amplifikált termékek agaróz gélben (1,6%) történő analízise lehetővé tette, hogy a 10 kiválasztott λ gt11 klón méretét meghatározzuk, melyet 2–3,5 kb-nak találtunk.

Annak érdekében, hogy a klónozott DNS-ek restriktációs térképét meghatározzuk, a λ gt11-vektor inszertjeit pUC18-plazmidba klónoztuk [Yanish-Perron és munkatársai: Gene 33 103, (1985)]. Ily módon 6 inszert szubklónját kaptuk meg.

A 6 inszert restriktációs térképét elkészítettük; a 6 közül 5 esetben közös régiót találtunk, mely arra utal, hogy ez az 5 inszert azonos genomialis fragmensből származik. Ezt megerősítette a *Lactococcus lactis* genomialis DNS restriktációs fragmenseivel történő Southern-féle hibridizáció, melynek során a fragmenseket agaróz gélben választottuk el, majd ³²P-vel radioaktívan jelzett inszertekkel együtt nejlonmembránra vittük.

Az 5 inszert közül 4-nek a restriktációs térképe az 1. ábrán látható.

A bemutatott inszertek mérete 3 kb, 2,7 kb, 2 kb és 3 kb. Mivel az inszertek átfedik egymást, a klónozott régió teljes mérete 4,5 kb.

A 6. klón, mely egy olyan inszertet tartalmaz, mely semmilyen hasonlóságot nem mutat a másik 5 klón megfelelő inszertjeivel, egy másik genomialis DNS-fragmensből származik.

Annak eldöntésére, hogy vajon a két klónozott DNS-fragmens közül az egyik tartalmazza-e a *Lactococcus lactis* malolaktikus enzimét kódoló gén 5'-regióját, Southern-féle hibridizációt alkalmaztunk, melynek során az inszerteket agaróz gélben választottuk el, majd a malolaktikus enzim N-terminális szekvenciájából származó oligonukleotid hibridizációs próbával nejlonmembránra vittük (P. Renault: korábban idézett közlése). A kiválasztott hibridizációs próba az első 6 aminosavat tartalmazó szekvenciából levezethető oligonukleotidok keveréke:

kódoló gén 5'-vége benne van az 5 klónozott inszertben. Másfelől, a 6. klón esetében hibridizáció nem volt megfigyelhető.

e) A P153A klón szekvenciája

Az 5 klón közül a 2,7 kb inszertet tartalmazó P153A-nak meghatároztuk a nukleotidszekvenciáját. A szekvenálást dideoxi-terminációs módszerrel, Applied Biosystem által forgalmazott szekvenátorral végeztük. Az inszert teljes szekvenciáját, valamint az abból levezethető aminosavszekvenciát az 1. szekvenaciaazonosító számon közöljük. A malolaktikus gént kódoló régió 1620 nukleotidból áll. Az első 20 aminosav, melyet a kapott nukleotidszekvenciából vezetünk le, azonos a tisztított enzim szekvenálásakor kapottal, azzal az eltéréssel, hogy a tisztított enzim 14. aminosava cisztein, a nukleotidszekvenciából levezethető lizinnel szemben. Ez a nyitott leolvasási fázis egy 53 kD móltömegű fehérjét kódol, mely tökéletesen összeegyeztethető a *Lactococcus lactis* malolaktikus enzimjének géliszűrőssel és SDS-PAGE-eljárással kapott molekulatömegével (60 kD).

Az 1. azonosítószámú szekvenancia tartalmaz további 465 nukleotidot a transzlációs iniciációs kodontól 5'-irányban. Ez a szekvenancia tartalmazza a malolaktikus enzim gén egész promotert. A *Lactococcus lactis* promoterei 150 nukleotid nagyságrendűek az iniciációs kodontól 5'-irányban. Továbbá a *Lactococcus lactis* gének transzkripciójának iniciálására jellemző szignálok is megtalálhatók.

A nyitott leolvasási fázistól 3'-irányban 596 nukleotidot szekvenáltunk meg, és a malolaktikus géntől 3'-irányban – eltérő leolvasási fázisban – egy másik, 581 nukleotid hosszúságú nyitott leolvasási fázist találtunk.

A génekhez, vagy az ismert fehérjékhez viszonyított hasonlóság meghatározását az 1. azonosítószámú nukleotidszekvenciának adatbázisokból származó fehérjeszekvenciákkal történő összehasonlításával végeztük.

Ami az 1620 nukleotid hosszúságú nyitott leolvasási fázist illeti, a különböző malátenzimekkel összehasonlítva jelentős mértékű az olyan konzervatív aminosav- és nukleotidszekvenciák jelenléte, melyek a malát piruváttá történő dekarboxilezéséért felelősek.

Találtunk ezenfelül NAD-kötésért felelős konszenzusszekvenciát is.

Ezek a homológiák tökéletesen összeegyeztethetőek a malolaktikus enzim funkciójával, miszerint – lévén malátenzim – szubsztrátja az almasav (malát), és a szubsztrát tejsavvá (laktáttá) történő átalakításához NAD-ot igényel.

A malolaktikus géntől 3'-irányban azonosított nyitott leolvasási fázis szintén jelentős (körülbelül 40%-os) aminosavhomológiát mutat, a citrát permeázzal összehasonlítva. Nagyon valószínűnek látszik, hogy ez a nyitott leolvasási fázis a malát permeáz 5'-régióját tartalmazhatja.

Ennek megfelelően úgy tűnik, hogy a szekvenált DNS-fragmens a malolaktikus enzimet kódoló struktúrgént és a malát permeáz gén egy részét tartalmazza, valamint, hogy ezek a gének egy operonba vannak rendeződve.

5. példa

A malolaktikus gén expressziója *E. coli*-ban

A malolaktikus gén *E. coli*-ban történő expresszióját a DH5 α baktériumtörzs különböző transzformánsai-

ban vizsgáltuk: p153A (szekvenált klón), p5A, p191A (a restriktációs térképek az 1. ábrán láthatók).

A transzformánsokat és a pUC18-cal transzformált kontrolltörzset egyaránt egy sor növekvő malátkoncentrációval rendelkező táptalajon szaporítottuk: 3 ml M9 táptalaj (Na₂HPO₄ 7H₂O 6 g/l, KH₂PO₄ 3 g/l, NaCl 0,5 g/l, NH₄Cl 1 g/l, glükóz 4 g/l), 1 mg/ml tiamminal, 20 mg/ml aszparaginsavval és 20 mg/ml ampicillinnel kiegészítve, továbbá 0; 0,3; 0,5 vagy 1% (vegyes%) malátkoncentrációval. A táptalaj pH-ját 6,5-re állítottuk citromsav felhasználásával.

A tenyészetet 37 °C-on kevertetve inkubáltuk 48 órán át.

Kontrollképpen *Lactococcus lactis*-t tenyésztettünk 8 ml M9-táptalajon, mely 5 g/l élesztőkivonatot tartalmaz, továbbá a malátot az előzővel azonos koncentrációtartományban. A tenyészetet 28 °C-on 48 órán át inkubáltuk anaerob körülmények között.

A tenyészetet ezután 10 percig 1000 g-vel centrifugáltuk. A felülúszót összegyűjtöttük, majd L-laktát-tartalomra vizsgáltuk. Az L-laktát mérését egy kereskedelmi forgalomban beszerezhető reagenskészlettel (Boeringer) végeztük, a gyártó erre vonatkozó előírásai szerint.

Az eredmények, melyeket az 1. táblázat tartalmaz (g/l-ben kifejezve), a transzformáns p153A és p191A tenyészet felülúszóiban nagyon tisztán tejsavtermelést mutatnak, míg a laktát nyomokban sem mutatható ki a kontrolltörzs (*E. coli* DH5 pUC18-cal transzformálva) felülúszójában. Egy másik transzformáns – a P5A – azonban, melyet azonos körülmények között vizsgáltunk, nem termel tejsavat. Ez azzal a ténnyel magyarázható, hogy a p5A rekombináns vektor által hordozott malolaktikus gén 3'-végéről 200 nukleotid hiányzik. Ezért úgy tűnik, hogy ennek a régióknak a megléte feltétlenül szükséges a malolaktikus aktivitáshoz.

A malátot nem tartalmazó tenyészetekben, sem a p153A és p191A transzformánsok, sem a pUC18-cal transzformált kontrolltörzs tenyészeiben nem termelődött tejsav. Ez azzal magyarázható, hogy az *E. coli* ilyen körülmények között nem termel L-laktátot.

Malát jelenlétében a kontrolltörzs esetében nem figyelhető meg laktáttermelés. Másfelől azonban, a transzformáns p153A és p191A törzsek esetében egyértelmű tejsavtermelést lehet megfigyelni 0,1; 0,3 és 1% malátkoncentráció esetében.

A termelt tejsav koncentrációja meglehetősen alacsony a *L. lactis* kontrollhoz képest, melyet azonos módon és ugyanazon kiinduló malátkoncentrációk esetében vizsgáltunk. Meg kell azonban említeni, hogy a *L. lactis* a malolaktikus fermentáción kívül nagy mennyiségben termel L-laktátot a cukrok lebontásával is, az L-LDH közvetítésével, mely a piruváttól tejsavvá alakítja.

Nehéz meghatározni továbbá a malátnak azt a hányadát, mely ténylegesen elérhető a malolaktikus fermentáció számára. Valójában lehetséges, hogy az *E. coli* tenyésztési körülményei között a malát jelentős hányada a trikarbonsav ciklusban vesz részt.

1. táblázat

Baktériumtörzs	% malát a táptalajban			
	0,001	0,017	0,008	0,015
<i>E. coli</i> DH5 α (pUC18)	0,001	0,017	0,008	0,015
<i>E. coli</i> (p153A)	0,015	0,12	0,23	0,31
<i>E. coli</i> (p191A)	0,017	0,17	0,15	0,2
<i>Lactococcus lactis</i>	2,6	5,09	8,5	–

6. példa

A malolaktikus gén expressziója élesztőben

Annak érdekében, hogy a malolaktikus enzim élesztőben klónozott génjét expresszáltassuk, a kódolórégiót az élesztő szabályozóelemeinek (promoterek és terminátorok) irányítása alá helyeztük élesztő / *E. coli* ingázó vektorokban (shuttle vektorokban).

a) *A malolaktikus enzim bevitele a pVT100-U nagy kópiaszámú plazmidba*

A pVT100-U expressziós plazmidot alkalmaztuk. Ez a plazmid tartalmazza az élesztő 2 μ replikációs origóját, a szelektálható URA3 markert, az erős ADH szabályozóelemeket (alkohol dehidrogenáz I promoter és terminátor), valamint a bakteriális elemeket (az ampicillin rezisztencia gén replikációs origóját).

A plazmidot Vernet és munkatársai írták le [Gene 52, 225 (1987)].

A malolaktikus gén kódolórégióját, a p153A-plazmiddal kezdve PCR-rel amplifikáltuk, a malolaktikus gén szekvenciájából származó oligonukleotidokat tartalmazó láncindítók alkalmazásával.

A klónozást elősegítendő, az amplifikáció során a kódolórégiótól 5'-irányban egy XhoI restriktions helyet, a kódolórégiótól 3'-irányban pedig egy XbaI helyet építettünk be. A következő oligonukleotidokat alkalmaztuk láncindítóként:

– egy olyan oligonukleotid, mely lehetővé teszi a kódolórégió izolálását az ATG translációs iniciációs kodon szintjén (1. láncindító), továbbá tartalmaz egy XhoI helyet,

– a 3'-oldalra választott oligonukleotid pedig (3'-láncindító) a translációs stopkodontól néhány nukleotidnyira 3'-irányban képes hibridizálódni.

Az alkalmazott láncindítók szekvenciája és pontos elhelyezkedése a 2. ábrán található.

Az amplifikációt a következő leirat szerint végeztük:

1. láncindító	4 μ l (30 pmol)
2. láncindító	4 μ l (30 pmol)
10X Taq puffer	10 μ l
Taq polimeráz (5 E/ μ l)	0,5 μ l
dNTP 2 μ mol/l	10 μ l
MgCl ₂ 25 mmol/l	6 μ l
p153A	4 μ l (40 ng)
H ₂ O	62 μ l

Az amplifikáció körülményei: 30 mp 94 °C-on, 30 mp 40 °C-on, 1 perc 72 °C-on, 30 ciklusban.

Az amplifikált fragmensek méretét a belőlük vett mintákból agaróz gélben határoztuk meg.

Az amplifikált fragmensekből 100 ng-ot XhoI és XbaI restriktions endonukleázokkal emésztettünk, majd a pVT100-U-vektor 50 ng-jával ligáltuk, mely vektort előzetesen XhoI- és XbaI-enzimekkel emésztettünk, majd defoszforiláltunk.

A kapott, pM1-nek nevezett pVT100-U-vektorszármazékot a 3. ábra mutatja be.

b) *Az élesztő transzformálása*

A *Saccharomyces cerevisiae* SCV5M élesztőtörzset a pM1-vektorral transzformáltuk. Az SCVM törzset 1992. jún. 18-án helyeztük letétbe a „Collection Nationale de Cultures de Microorganismes”-ben, melyet a Pasteur Intézet tart fenn, I-1222 deponálási számon. Ez egy laboratóriumi törzs, mely haploid, ura⁻, MATa és egy oenológiai törzsből származik.

Az alkalmazott transzformációs eljárás az Ito és munkatársai által leírt lítium-acetátos módszer [J. Bacteriol. 153, 163 (1983)].

c) *A malolaktikus fermentáció kivitelezése élesztővel*

A kapott transzformánsok közül kettőt, melyek megjelölése ScV5M/pM1a és ScV5M/pM1b, malolaktikus fermentációs kapacitásuk (a malát tejsavvá alakítása) szempontjából vizsgáltuk. A transzformánsokat a következő feltételek között tenyésztettük:

– egyrészt az YNB szintetikus minimáltáptalajban (6,7 g/l „yeast nitrogen base without amino acid” (DIFCO), 20 g/l glükóz], mely 0; 0,6 vagy 1% malátot tartalmazott, melynek pH-ját 3-ra vagy 6-ra állítottuk be, mindkét esetben citromsavval (6,3 g/l),

– másrészt a szőlőmust összetételét imitáló szintetikus táptalajban [Sablayrolles és Barre: Sciences des Aliments, 6, 373 (1986)], melyet pH=3,3-ra puffereltünk.

A két alkalmazott táptalaj nem tartalmaz uracilt, mely lehetővé teszi a plazmidok szelekcióját.

Az inszertet nem tartalmazó pVT100-U-plazmiddal transzformált ScV5M törzs volt a negatív kontroll.

A tenyésztés és az analízis körülményei

Az élesztőtörzsekkel (transzformánsok és a kontroll) 8 ml tápoldatot oltunk be.

A tenyésztést steril 10 ml-es csövekben, 28 °C-on, 60 órán át, kevertetés nélkül végeztük.

Ezután a tenyészetet 5 percig 4000 g-vel centrifugáltuk és a felülúszót L-laktát-tartalomra az 5. példában leírtak szerint Boeringer-reagenskészlettel vizsgáltuk.

Eredmények

A kapott eredményeket a 2. táblázat mutatja be.

Az YNB szintetikus minimáltáptalajban a kontroll élesztő esetében (2. táblázat) sem malát hiányában, sem annak jelenlétében nem lehetett L-laktózt nyomokban sem kimutatni.

Ez teljesen összhangban áll azzal a ténnyel, hogy az *S. cerevisiae* nem képes a malátot laktáttá alakítani, továbbá azzal, hogy anaerob körülmények között is csak nagyon kevés laktátot termel glükózból, és az főleg D-laktát.

A pM1a és pM1b transzformált törzsek malát hiányában csak nyomokban termelnek laktátot, körülbelül 50–100 mg-ot. Valószínű, hogy ez a csekély termelés a malolaktikus enzim működésének eredménye, mely az

élesztőben a glükóz metabolizmusa során keletkező endogén malát felhasználásán alapul. Ha a táptalaj és a pH=3-ra beállított YNB-táptalaj malátot is tartalmaz (0,6 és 1% malát), vagy a szintetikus táptalaj esetében (pH=3,3; 3 g/l malát), szignifikáns L-laktát-termelés tapasztalható (0,5–0,7 g/l a pM1a-klón esetében, azonos kísérleti körülmények között).

A legnagyobb mértékű termelés a szintetikus táptalaj esetében tapasztalható, melynek összetétele nagyon hasonló a szőlőmustéhoz (0,7 g/l laktát, mely 7,7 μmol/ml-nek felel meg).

Ugyanilyen tenyésztési körülmények esetében (YNB), de pH=6-nál az L-laktát-termelés nagyon csekély, nagyságrendileg azonos tartományba esik, mint a malátot nem tartalmazó táptalajok esetében.

Az L-laktát-termelésben a pH függvényében tapasztalható eltérés azzal magyarázható, hogy pH=6-nál a malát nehezebben kerül be a *S. cerevisiae*-be. pH=3-nál, illetve pH=3,3-nál a malát nagy hányada (pK 3,5) disszociálatlan formában van, mely könnyebben tud a sejtbé diffundálni. Másfelől azonban, pH=6-nál a malát főleg disszociált formában van, mely sokkal nehezebben kerülhet a sejt belsejébe.

A rekombináns törzsek tehát képesek lebontani a malátot laktáttá a malolaktikus fermentáció révén, továbbá savas pH-n – vagyis az oenológiaiakhoz hasonló körülmények között – nagyobb hatékonysággal teszik mindezt.

2. táblázat

Laktát meghatározása *S. cerevisiae*-ben

Élesztőtörzs	Termelt L-laktát (g/l)	Termelt L-laktát (μmol/ml)
ScVRM/pVT100-U		
pH=3 esetében:		
0% malát	$2,4 \times 10^{-3}$	0,02
0,6% malát	7×10^{-3}	0,07
1% malát	9×10^{-3}	0,1
pH=6 esetében:		
0% malát	3×10^{-3}	0,03
0,6% malát	6×10^{-3}	0,06
1% malát	10×10^{-3}	0,11
Szintetikus táptalaj esetében:		
pH=3,3	9×10^{-3}	0,1
ScVSM/pM1a		
pH=3 esetében:		
0% malát	0,15	1,66
0,6% malát	0,4	4,4
1% malát	0,52	5,7
pH=6 esetében:		
0% malát	0,1	1,1
0,6% malát	0,07	0,77
1% malát	0,05	0,55

Élesztőtörzs	Termelt L-laktát (g/l)	Termelt L-laktát (μmol/ml)
5 Szintetikus táptalaj esetében:		
pH=3,3	0,7	7,7
10 ScVSM/pmlb		
pH=3 esetében:		
0% malát	0,15	1,66
0,6% malát	0,40	4,4
1% malát	0,48	5,3
15 pH=6 esetében:		
0% malát	0,11	1,22
0,6% malát	0,08	0,88
1% malát	0,056	0,62
20 Szintetikus táptalaj esetében:		
pH=3,3	0,51	5,66

Ugyanezen kísérleteket végeztük el szintetikus táptalajon is, és a laktáttermelést a tenyésztés 10. napja után mértük; 1,5 g/l (mely 17 μmol/ml-nek felel meg) laktát termelődött ilyen kísérleti körülmények között.

30 7. példa

A malolaktikus gén expressziója

Schizosaccharomyces pombe-ban

A malolaktikus gén expresszióját *Schizosaccharomyces pombe*-ban is vizsgáltuk. Ebben az esetben a malolaktikus gén kódoló régióját egy *S. pombe* promotor szabályozása alá helyeztük, egy *S. pombe*/*E. coli* ingázó vektorban.

a) A malolaktikus gén beépítése a nagy kópiaszámú pART1-plazmidba

40 Expressziós plazmidként a pART1-et alkalmaztuk. Ez a plazmid az élesztő ARS1 replikációs origóját és a LEU szelekciós markert, továbbá az alkohol dehidrogenáz promotert tartalmazza, valamint rendelkezik bakteriális elemekkel is (az ampicillin rezisztencia gén és replikációs origó).

45 Ezt a plazmidot McLeod és munkatársai írták le [Embo J. 6, 729 (1987)].

50 A malolaktikus gén kódoló régióját p153A-plazmidból kiindulva, PCR-rel amplifikáltuk, a malolaktikus gén szekvenciájából származó oligonukleotidokat tartalmazó láncindítók segítségével. A klónozás elősegítése céljából az amplifikáció során a kódoló régiótól 5'-irányban BamHI restrikciós helyet, 3'-irányban pedig SacI restrikciós helyet építettünk be.

55 Láncindítóként a következő oligonukleotidokat alkalmaztuk:

– egy olyan oligonukleotid, mely lehetővé teszi kódoló régió izolálását az ATG translációs iniciációs kodon szintjén (12. láncindító) és BamHI helyet tartalmaz,

– a 3'-végi választott oligonukleotid (13. láncindító) a translációs stopkódotól néhány nukleotidnyira 3'-irányban hibridizálódik, és SacI helyet tartalmaz.

A szekvenciákat és az alkalmazott láncindítók pontos elhelyezkedését a 2. ábra mutatja be.

Az amplifikációt a következő leirat szerint végeztük:

12. láncindító	4 µl (20 pmol)
13. láncindító	4 µl (20 pmol)
10× Taq puffer	10 µl
Taq polimeráz (5E/µl)	0,5 µl
dNTP 2 µmol/l	10 µl
MgCl ₂ 25 mmol/l	6 µl
p153A	10 µl (100 ng)
H ₂ O	65,5 µl

Az amplifikáció körülményei: 30 mp 94 °C-on, 30 mp 37 °C-on, 1 perc 72 °C-on, 30 ciklusban.

Az amplifikált fragmensek 100 ng-ját BamHI és SacI restrikciós enzimekkel emésztettük, majd 50 ng, előzetesen BamHI-gyel és SacI-gyel emésztett és defoszforilált pART1-vektorral ligáltuk.

A kapott vektort, melyet pD4-nek neveztünk, a 4. ábra mutatja be.

b) A *S. pombe* transzformálása

Egy leucin-auxotrof *S. pombe* törzset pD4- és pART1-vektorokkal transzformáltunk. Ez egy laboratóriumi leu-132h-törzs, mely J. Kohli-tól („Institute of General Microbiology”, Raltzerstrasse 4, CH-3012, Bern, Switzerland) származik.

Az alkalmazott transzformációs eljárás egy lítium-acetátos transzformációs eljárás, melyet Ito és munkatársai [J. Bacteriol. 153, 163 (1983)] írtak le.

c) A malolaktikus fermentációs termelés az *S. pombe* esetében

A kapott transzformánsok közül egynek, melyet Sp/D42-nek neveztünk, vizsgáltuk a malolaktikus fermentációs kapacitását (a malát átalakítása laktáttá). A transzformánsokat az alábbi körülmények között tenyésztettük.

– YND szintetikus minimáltáptalaj, mely 50 g/l glükózt és 5,5 g/l malátot tartalmaz, melyet pH=3,5-re vagy pH=6-ra puffereltünk. Ez a táptalaj nem tartalmaz leucint, ami lehetővé teszi a beépített plazmidok szelekcióját.

Negatív kontrollként ugyanezen törzs inszertet nem tartalmazó pART1-plazmiddal transzformált változata szolgált.

Az élesztőtörzsekkel (transzformánsok és kontroll) 8 ml táptalajt oltunk be. A tenyésztést 10 ml-es steril csövekben végeztük, 40 °C-on, egy héten keresztül, kevertetés nélkül.

A tenyészeteket 5 percig 4000 g-vel centrifugáltuk, és a felülúszót L-laktát-termelésre Boeringer-reagenskészlet alkalmazásával vizsgáltuk, a fent leírtakkal azonos módon. Az L-malát bomlását az L-malát-maradék mérésén keresztül (Boeringer-reagenskészlet) számitottuk.

A kapott eredményeket a 3. táblázat mutatja be.

A különböző vizsgált tenyésztési körülmények között a kontroll Sp/pART1 élesztő nagyon kevés laktátot

termelt (20–40 mg/l nagyságrendben). Továbbá az *S. pombe* az *S. cerevisiae*-hoz hasonlóan nem képes a malátot laktáttá alakítani, másfelől pedig anaerob körülmények között is csak igen kevés laktátot termel glükóz felhasználásával.

A malolaktikus génnel transzformált törzs (Sp/D42) malát hiányában nagyon kis mennyiségű laktátot termel 170–300 mg/l nagyságrendben. Ez az alacsony szintű termelés valószínűleg a glükózból származó endogén malát egy részének malolaktikus fermentációja által következik be. Ezt a *S. cerevisiae* transzformánsok esetében is megfigyeltük (2. táblázat). A táptalajban lévő 5,5 g/l maláttartalom esetén nagymértékű L-laktát-termelés figyelhető meg az Sp/D42 transzformáns esetében, mely 2,4–3 g/l, a táptalaj pH-jától függően. A legintenzívebb termelés savas pH-n, azaz oenológiai pH-viszonyok között figyelhető meg. A pH=6 értéken kapott termelés szintén nagyon nagy mértékű, a *S. cerevisiae* azonos pH-n mért termeléséhez képest.

Másrészt, 5,5 g/l L-malát jelenlétében savas pH-n az Sp/D42 transzformáns képes gyakorlatilag a táptalajban lévő összes malát lebontására (pH=3,5-nél csak 150 mg/l malát nem bomlott le), sőt a jelen lévő malátnak több mint 80%-át képes L-laktáttá alakítani (3,05 g/l).

3. táblázat

Laktát meghatározása *S. pombe*-ban

Élesztőtörzs	Termelt L-laktát (g/l)	Maradék L-laktát (µmol/ml)
Sp/pART1		
pH=3,5 esetében:		
0% malát	nem kimutatható	
0,55% malát	0,04	1,4
pH=6 esetében:		
0% malát	0,02	
0,55% malát	0,03	4,6
Sp/D42		
pH=3,5 esetében:		
0% malát	0,17	
0,55% malát	3,5	0,15
pH=6 esetében:		
0% malát	0,3	
0,55% malát	2,4	1,5

SZEKVENCIALISTA

55 AZ 1. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA ADAITAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 2684 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

60 TOPOLOGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: DNS (genomiális)
 HIPOTETIKUS: nem
 ANTISZENZS: nem
 EREDETI FORRÁS:
 ORGANIZMUS
 TOVÁBBI SAJÁTSÁG:
 NÉV/MEGJELÖLÉS: CDS
 ELHELYEZKEDÉS: 466–2085

EGYÉB INFORMÁCIÓ: termék=„malolaktikus
 enzim”
 TOVÁBBI SAJÁTSÁG:
 NÉV/MEGJELÖLÉS: –35jel
 ELHELYEZKEDÉS: 392–397
 TOVÁBBI SAJÁTSÁG:
 NÉV/MEGJELÖLÉS: –10jel
 ELHELYEZKEDÉS: 416–421

AZ 1. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

TTTTGTTGAA AAAATTTCTA ATCAAATTAT TAACCTAAAA GATACATAAA TTTAAAAAAT
 AAAAGTAGAG TGATTTTACT CTACTTTTTT AGAATACTTT TATATAATAG GAAATATGAA
 TAAAGCAAAG CGCACAATTT TGGTTTTATT TAAAAAATG GATACCTTAG ATACACAACC
 ACCATTGACA AAAAATCTTA ATCCTAAATT GGTTGAAACC CTGATAAATT AGGGATAGTA
 ATAGGAGGAG GACAGTTTAT CATTTAATAG TTATAAGCTA ATTTTTACTA CCATTTCTTT
 GATTAATATC ATCTATTTTT ATATAGAGAC TTTTAAATAA ACATTGACAT TATTTATGCG
 TTATAAATTA AATTTATCAA CACTAAGGAA TTTGACTATA ACGATAAAAG AAGTTTATAG
 TAATAAAGTA ATAACATTAA TTATAATTTT AATGGAGGTT GTACG ATG CGT GCA
 Met Arg Ala
 1
 CAT GAA ATT TTA AAC AAT CCT TTT TTA AAT AAA GGA ACA GCT TTT ACT
 His Glu Ile Leu Asn Asn Pro Phe Leu Asn Lys Gly Thr Ala Phe Thr
 5 10 15
 ATG AAA GAC CGT CAA GAA TTG GGG TTG ATT GGT CTT CTT CCA CCA ACT
 Met Lys Asp Arg Gln Glu Leu Gly Leu Ile Gly Leu Leu Pro Pro Thr
 20 25 30 35
 GTT CAA ACA ATT GAG GAA CAA GCT GAA CAA ACT TAC GAA CAA TAT TTG
 Val Gln Thr Ile Glu Glu Gln Ala Glu Gln Thr Tyr Glu Gln Tyr Leu
 40 45 50
 ACA AAA CCA TCT GAT TTA GAA AAA CGT CAT TTC TTG ATG GAA ATT TTT
 Thr Lys Pro Ser Asp Leu Glu Lys Arg His Phe Leu Met Glu Ile Phe
 55 60 65
 AAT ACA AAC CGT ACT TTG TTT TAC TAC TTA TTC AAC AAA CAT ATT GTA
 Asn Thr Asn Arg Thr Leu Phe Tyr Tyr Leu Phe Asn Lys His Ile Val
 70 75 80
 GAA TTT AAT CCA GTT GTT TAT GAT CCA ACA ATT GCT GAT ACA ATT GAA
 Glu Phe Asn Pro Val Val Tyr Asp Pro Thr Ile Ala Asp Thr Ile Glu
 85 90 95
 AAC TAC AGT CAT TTG TTC GTA GAT CCA CAA TAT GCT GCT TAT CTT GAT
 Asn Tyr Ser His Leu Phe Val Asp Pro Gln Tyr Ala Ala Tyr Leu Asp
 100 105 110 115
 ATT AAC CAC CCT GAA AAC ATT ACT GAA ACA TTG AAA AGT GCA GCA GGT
 Ile Asn His Pro Glu Asn Ile Thr Glu Thr Leu Lys Ser Ala Ala Gly
 120 125 130
 GAC AGA GAA ATT CGT CCT ATT GTT GTA ACT GAT GCT GAA GGA ACC CTT
 Asp Arg Glu Ile Arg Pro Ile Val Val Thr Asp Ala Glu Gly Thr Leu
 135 140 145
 GGT ATT GGA GAC TGG GGA ACT CAA GGT GTT GAT ATC TCA GTT GGT AAA
 Gly Ile Gly Asp Trp Gly Thr Gln Gly Val Asp Ile Ser Val Gly Lys
 150 155 160
 TTA ATG ATT TAT ACA GCC GCA GCA GGT ATT GAT CCA GCG TCT GTA CTT
 Leu Met Ile Tyr Thr Ala Ala Ala Gly Ile Asp Pro Ala Ser Val Leu
 165 170 175
 CCA GTT GTT ATT GAT GCA GGG ACA AAT AGG AAA GGA CTT TTA GAA GAT
 Pro Val Val Ile Asp Ala Gly Thr Asn Arg Lys Gly Leu Leu Glu Asp
 180 185 190 195
 CAT TTG TAT CTT GGA AAT CAT CAA GAA CGT ATT TAC GGT GAT CAA TAC
 His Leu Tyr Leu Gly Asn His Gln Glu Arg Ile Tyr Gly Asp Gln Tyr
 200 205 210

HU 217410 B

TAC	AGT	TTC	GTC	GAT	CAA	TTT	GTA	GAA	ACT	GCA	GAA	TCA	ATT	TTC	CCT
Tyr	Ser	Phe	Val	Asp	Gln	Phe	Val	Glu	Thr	Ala	Glu	Ser	Ile	Phe	Pro
			215					220					225		
AAA	TTG	TAC	CTT	CAC	TGG	GAA	GAT	TTC	GGA	CGT	TCA	AAT	GCT	GCA	ACA
Lys	Leu	Tyr	Leu	His	Trp	Glu	Asp	Phe	Gly	Arg	Ser	Asn	Ala	Ala	Thr
		230					235					240			
ATT	TTA	AAT	AAC	TAC	AAA	ACA	AAA	ATC	CCA	ACA	TTT	AAT	GAT	GAC	ATT
Ile	Leu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Lys	Ile	Pro	Thr	Phe	Asn	Asp	Asp	Ile
		245					250					255			
CAA	GGA	ACT	GGT	ATT	GTT	GTT	TTA	GGT	GGT	ATT	TTC	GGA	TCA	CTT	GAC
Gln	Gly	Thr	Gly	Ile	Val	Val	Leu	Gly	Gly	Ile	Phe	Gly	Ser	Leu	Asp
260						265					270				275
ATT	ACA	GGT	GAA	AAA	TTA	ACT	GAT	CAA	GTA	TAT	CTT	TGC	TAT	GGT	GGT
Ile	Thr	Gly	Glu	Lys	Leu	Thr	Asp	Gln	Val	Tyr	Leu	Cys	Tyr	Gly	Gly
							280				285				290
GGT	TCA	GCC	GGT	GCA	GGG	ATT	GCT	GGT	CGT	GTT	CAT	GCT	GAA	ATG	GTT
Gly	Ser	Ala	Gly	Aln	Gly	Ile	Aln	Gly	Arg	Val	His	Ala	Glu	Met	Val
															295
AGT	GAA	GGT	CTT	TCT	GAA	GAA	GAA	GCT	TAC	AAA	CAT	TTC	TTC	ATG	ATT
Ser	Glu	Gly	Leu	Ser	Glu	Glu	Glu	Ala	Tyt	Lys	His	Phe	Phe	Met	Ile
			310					315							320
GAT	CAA	CAA	GGT	TTA	CTT	TTT	GAT	GAT	ATG	GAA	GAC	CTT	ACA	CCA	GCT
Asp	Gln	Gln	Gly	Leu	Leu	Phe	Asp	Asp	Met	Glu	Asp	Leu	Thr	Pro	Ala
							325					330			335
CAA	AAA	CCA	TTT	GCT	AAA	AAA	CGT	GCT	GAT	TAT	AAA	GAT	GCT	GGA	GAT
Gln	Lys	Pro	Phe	Ala	Lys	Lys	Arg	Ala	Asp	Tyr	Lys	Asp	Ala	Gly	Asp
340							345				350				355
ATG	ACT	GAC	CTT	CTT	AAC	GTT	GTT	AAG	ACA	GTA	AAA	CCA	ACT	ATT	TTA
Met	Thr	Asp	Leu	Leu	Asn	Val	Val	Lys	Thr	Val	Lys	Pro	Thr	Ile	Leu
							360								370
GTA	GGA	ACT	TCA	ACT	AAT	CCA	GGT	GCC	TTT	ACA	AAA	GAA	GTT	GTT	GAA
Val	Gly	Thr	Ser	Thr	Asn	Pro	Gly	Ala	Phe	Thr	Lys	Glu	Val	Val	Glu
															375
GCA	ATG	TGT	GCT	AAT	ACA	GAA	CGC	CCA	GTA	ATC	TTC	CCT	ATC	TCA	AAT
Ala	Mec	Cys	Ala	Asn	Thr	Glu	Arg	Pro	Val	Ile	Phe	Pro	Ile	Ser	Asn
							390								400
CCA	ACT	AAA	AAA	ATG	GAA	ACT	ACA	GCT	GAA	CAA	GTT	ATT	GAG	TGG	TCT
Pro	Thr	Lys	Lys	Met	Glu	Thr	Thr	Ala	Glu	Gln	Val	Ile	Glu	Trp	Ser
							410								415
GAT	GGA	AAA	GCT	TTT	GTC	GCT	ACT	GGT	GTT	CCT	TCA	GGA	ACA	ATC	AGC
Asp	Gly	Lys	Ala	Phe	Val	Ala	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Gly	Thr	Ile	Ser
420							425				430				435
TAC	AAA	GGT	GTT	GAT	TAT	CAA	ATT	GGT	CAA	GCA	AAT	AAC	TCA	CTT	ATC
Tyr	Lys	Gly	Val	Asp	Tyr	Gln	Ile	Gly	Gln	Ala	Asn	Asn	Ser	Leu	Ile
							440								445
CAC	CCA	GGT	TTG	GGC	TTA	GGA	ATG	TTG	GCA	TCT	GAA	GCA	AAA	CTT	TTG
His	Pro	Gly	Leu	Gly	Leu	Gly	Met	Leu	Ala	Ser	Glu	Ala	Lys	Leu	Leu
															455
ACA	GAT	GAA	ATG	ATC	GGT	GCA	GCT	GCA	CAT	TCA	TTG	AGC	GGT	TTA	GTA
Thr	Asp	Glu	Met	Ile	Gly	Ala	Ala	Ala	His	Ser	Leu	Ser	Gly	Leu	Val
															470
GAT	CCA	GGT	AAA	CCA	GGT	GCT	CCT	GTT	CTT	CCT	CCA	TTT	GAA	TTT	GTT
Asp	Pro	Gly	Lys	Pro	Gly	Ala	Pro	Val	Leu	Pro	Pro	Phe	Glu	Phe	Val
							485								490
GCT	GAT	GTA	TCA	ATT	AAA	GTT	GCA	GAA	GCA	GTT	GCT	AAG	AAA	GCT	CAA
Ala	Asp	Val	Ser	Ile	Lys	Val	Ala	Glu	Ala	Val	Ala	Lys	Lys	Ala	Gln
500							505					510			515
GAA	CAA	GGT	CTT	ACT	GAA	TCT	AAA	GAA	ACT	GAT	ATG	GCT	AAA	GCA	GTT
Glu	Gln	Gly	Leu	Thr	Glu	Ser	Lys	Glu	Thr	Asp	Met	Ala	Lys	Ala	Val
							520								525
															530

CGT GAT CTT AAA TGG TAT CCA GAG TAC TAAGGGGAAT ATCTTAAATG

Arg Asp Leu Lys Trp Tyr Pro Glu Tyr

535

540

AAAAAACTTA AAGAAACGAA AATATCGGGA ATTAGTCTTC CCTTATATGC CTTTTTCGTA
 GCTGTCATCA TAGTTGTAAC ACTATTAGGA AAACCTCCAC TTGATATGGT AGGGTTAACT
 CTCCTACTTG TAACATTAGG CCACCTATTA TACTTCATAG GAGAAAAATT CCCTATTATG
 AATTCATACT TAGGTGGGGG ATCTGTTTTT ACTTTAATTG GTGCTACTCT ATTATCTTTC
 TTCCACATTG TTCCTTCAAA TGTTATTGGA GCAGTTTCCA ATTTTATGGG TGGAAAAATT
 GGATTTCTTG ATTTTATAT AGCTGCACTT ATCTGTGGAT CTATTTTAGG AATGAACAGA
 AATCTTTTGG TTAAAGCTTC CAAGAAATTT ATTCCGATTG CTTTAATCAC TATGGTTATT
 GGTTCCTTCT CAGTAGGTCT TGTAGGAATG CTTATTGGTA ATGGATTTCG TGATTCTGTA
 ATGTATGTTT CTATGCCAAT GATGTCAGGT GGTATGGGAG CCGGAATTAC TCACTCTCTC
 AAATCTATGC AGCCGGATTG GCTCATGGAA ACCAAGCAG

A 2. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI: 15 TÍPUSA: aminosav
 A SZEKVENCIA JELLEMZŐI: TOPOLÓGIÁJA: lineáris
 HOSSZA: 540 aminosav MOLEKULATÍPUS: protein

A 2. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Met	Arg	Ala	His	Glu	Ile	Leu	Asn	Asn	Pro	Phe	Leu	Asn	Lys	Gly	Thr
1				5					10					15	
Ala	Phe	Thr	Met	Lys	Asp	Arg	Gln	Glu	Leu	Gly	Leu	Ile	Gly	Leu	Leu
			20					25					30		
Pro	Pro	Thr	Val	Gln	Thr	Ile	Glu	Gln	Ala	Glu	Gln	Thr	Tyr	Glu	
			35				40					45			
Gln	Tyr	Leu	Thr	Lys	Pro	Ser	Asp	Leu	Glu	Lys	Arg	His	Phe	Leu	Met
	50					55					60				
Glu	Ile	Phe	Asn	Thr	Asn	Arg	Thr	Leu	Phe	Tyr	Tyr	Leu	Phe	Asn	Lys
	65				70					75					80
His	Ile	Val	Glu	Phe	Asn	Pro	Val	Val	Tyr	Asp	Pro	Thr	Ile	Ala	Asp
				85					90					95	
Thr	Ile	Glu	Asn	Tyr	Ser	His	Leu	Phe	Val	Asp	Pro	Gln	Tyr	Ala	Ala
			100					105					110		
Tyr	Leu	Asp	Ile	Asn	His	Pro	Glu	Asn	Ile	Thr	Glu	Thr	Leu	Lys	Ser
		115					120					125			
Ala	Ala	Gly	Asp	Arg	Glu	Ile	Arg	Pro	Ile	Val	Val	Thr	Asp	Ala	Glu
		130				135					140				
Gly	Thr	Leu	Gly	Ile	Gly	Asp	Trp	Gly	Thr	Gln	Gly	Val	Asp	Ile	Ser
				145		150				155				160	
Val	Gly	Lys	Leu	Met	Ile	Tyr	Thr	Ala	Ala	Ala	Gly	Ile	Asp	Pro	Ala
				165				170						175	
Ser	Val	Leu	Pro	Val	Val	Ile	Asp	Ala	Gly	Thr	Asn	Arg	Lys	Gly	Leu
			180					185					190		
Leu	Glu	Asp	His	Leu	Tyr	Leu	Gly	Asn	His	Gln	Glu	Arg	Ile	Tyr	Gly
		195					200					205			
Asp	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Phe	Val	Asp	Gln	Phe	Val	Glu	Thr	Ala	Glu	Ser
		210				215						220			
Ile	Phe	Pro	Lys	Leu	Tyr	Leu	His	Trp	Glu	Asp	Phe	Gly	Arg	Ser	Asn
				225		230				235					240
Ala	Ala	Thr	Ile	Leu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Lys	Ile	Pro	Thr	Phe	Asn
				245				250						255	
Asp	Asp	Ile	Gln	Gly	Thr	Gly	Ile	Val	Val	Leu	Gly	Gly	Ile	Phe	Gly
			260					265					270		
Ser	Leu	Asp	Ile	Thr	Gly	Glu	Lys	Leu	Thr	Asp	Gln	Val	Tyr	Leu	Cys
		275					280					285			
Tyr	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Gly	Ala	Gly	Ile	Ala	Gly	Arg	Val	His	Ala
	290					295					300				
Glu	Met	Val	Ser	Glu	Gly	Leu	Ser	Glu	Glu	Glu	Ala	Tyr	Lys	His	Phe
				305		310					315				320

Phe	Met	Ile	Asp	Gln	Gln	Gly	Leu	Leu	Phe	Asp	Asp	Met	Glu	Asp	Leu
				325					330					335	
Thr	Pro	Ala	Gln	Lys	Pro	Phe	Ala	Lys	Lys	Arg	Ala	Asp	Tyr	Lys	Asp
			340					345					350		
Ala	Gly	Asp	Met	Thr	Asp	Leu	Leu	Asn	Val	Val	Lys	Thr	Val	Lys	Pro
		355					360					365			
Thr	Ile	Leu	Val	Gly	Thr	Ser	Thr	Asn	Pro	Gly	Ala	Phe	Thr	Lys	Glu
	370					375					380				
Val	Val	Glu	Ala	Met	Cys	Ala	Asn	Thr	Glu	Arg	Pro	Val	Ile	Phe	Pro
385					390					395					400
Ile	Ser	Asn	Pro	Thr	Lys	Lys	Met	Glu	Thr	Thr	Ala	Glu	Gln	Val	Ile
				405				410					415		
Glu	Trp	Ser	Asp	Gly	Lys	Ala	Phe	Val	Ala	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Gly
			420					425					430		
Thr	Ile	Ser	Tyr	Lys	Gly	Val	Asp	Tyr	Gln	Ile	Gly	Gln	Ala	Asn	Asn
		435					440					445			
Ser	Leu	Ile	His	Pro	Gly	Leu	Gly	Leu	Gly	Met	Leu	Ala	Ser	Glu	Ala
	450					455					460				
Lys	Leu	Leu	Thr	Asp	Glu	Met	Ile	Gly	Ala	Ala	Ala	His	Ser	Leu	Ser
465					470					475					480
Gly	Leu	Val	Asp	Pro	Gly	Lys	Pro	Gly	Ala	Pro	Val	Leu	Pro	Pro	Phe
				485				490						495	
Glu	Phe	Val	Ala	Asp	Val	Ser	Ile	Lys	Val	Ala	Glu	Aln	Val	Ala	Lys
			500					505					510		
Lys	Ala	Gln	Glu	Gln	Gly	Leu	Thr	Glu	Ser	Lys	Glu	Thr	Asp	Met	Ala
		515					520					525			
Lys	Ala	Val	Arg	Asp	Leu	Lys	Trp	Tyr	Pro	Glu	Tyr				
	530					535					540				

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Nukleinsavmolekula, *azzal jellemezve*, hogy *Lactococcus lactis* malolaktikus enzimét kódoló 1620 bp hosszúságú szekvenciát, és adott esetben az enzim expresszióját megfelelő gazdasejtben biztosítani képes szabályozószekvenciákat és/vagy a molekula replikációját megfelelő gazdasejtben biztosítani képes szekvenciaelemeket tartalmaz.

2. Az 1. igénypont szerinti nukleinsavmolekula, *azzal jellemezve*, hogy a 2. szekvenciaazonosító számon megadott polipeptidet kódoló szekvenciát tartalmaz.

3. Az 1. igénypont szerinti nukleinsavmolekula, *azzal jellemezve*, hogy az 1. szekvenciaazonosító számon megadott szekvencia 466–2085. nukleotidjait tartalmazza.

4. Az 1. igénypont szerinti nukleinsavmolekula, *azzal jellemezve*, hogy a malolaktikus enzimet kódoló gént a gén expresszióját szabályozni képes szekvenciákhoz funkcionálisan kapcsoltn tartalmazza.

5. Az 1. igénypont szerinti nukleinsavmolekula, *azzal jellemezve*, hogy élesztőben működőképes szabályozószekvenciákat tartalmaz.

6. Az 1. igénypont szerint nukleinsavmolekula, *azzal jellemezve*, hogy a molekula replikációját megfelelő gazdasejtben biztosítani képes szekvenciaelemeket tartalmaz.

35 7. Az 1. igénypont szerinti nukleinsavmolekula, *azzal jellemezve*, hogy az enzim expresszióját megfelelő gazdasejtben biztosítani képes szabályozószekvenciákat, valamint a molekula replikációját megfelelő gazdasejtben biztosítani képes szekvenciaelemeket tartalmaz.

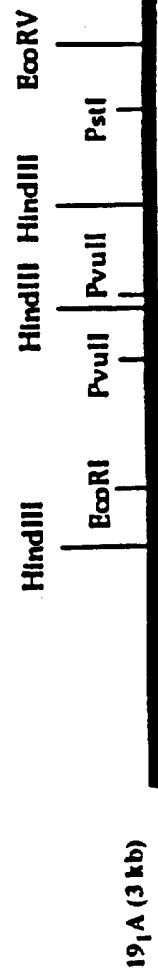
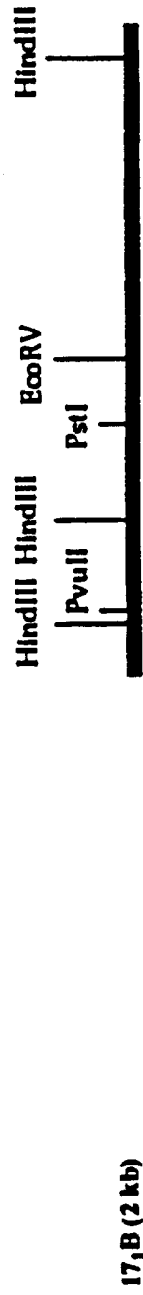
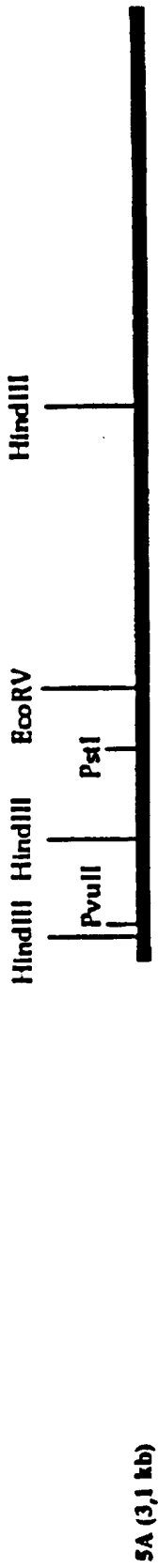
40 8. Transzformált eukarióta vagy prokarióta sejt, *azzal jellemezve*, hogy legalább egy, az 1–7. igénypontok bármelyike szerinti nukleinsavmolekulát tartalmaz.

9. A 8. igénypont szerinti transzformált sejt, *azzal jellemezve*, hogy élesztősejt.

45 10. A 9. igénypont szerint élesztősejt, *azzal jellemezve*, hogy a *Saccharomyces* nemzetséghez tartozik.

11. A 9. igénypont szerinti élesztősejt, *azzal jellemezve*, hogy a *Schizosaccharomyces* nemzetséghez tartozik.

50 12. Eljárás malolaktikus fermentáció végrehajtására, *azzal jellemezve*, hogy a fermentációt a 9–11. igénypontok bármelyike szerinti élesztősejt alkalmazásával hajtjuk végre.



200 bp

1. ábra

L. lactis szekvencia 5' ATCGTGCACATGA 3'

1. láncindító 5' GGCTCGAGATGCGTGCCACATGA 3'
XhoI

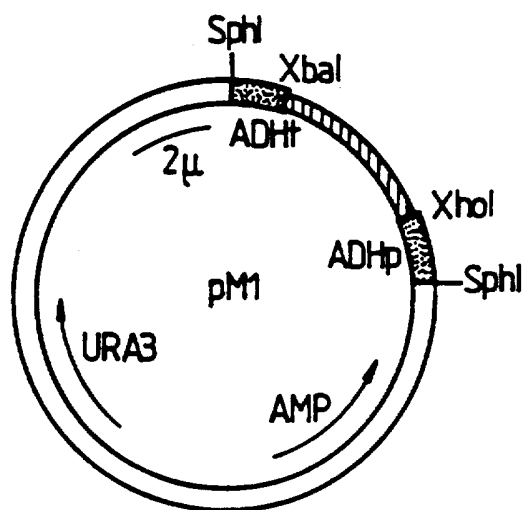
12. láncindító 5' TCGGATCCATGCGTGCCACATGA 3'
BamHI

L. lactis szekvencia 5' GAGTACIAAGGGGAATATCT 3'

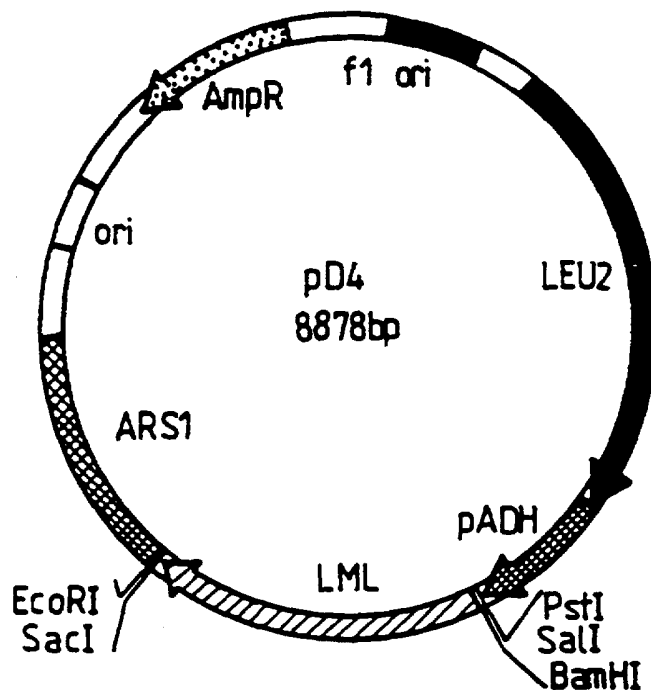
3. láncindító 3' ATGATCCCTTATAGATCIGT 5'
XbaI

13. láncindító 3' CTCATGATCCCTCGAGTC 5'
SacI

2. ábra



3. ábra



4. ábra