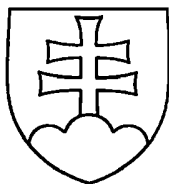


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA
VYNÁLEZU

(21) Číslo dokumentu:

744-2000

- (22) Dátum podania: 19.05.2000
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 199 24 365.4
(32) Dátum priority: 27.05.1999
(33) Krajina priority: DE
(40) Dátum zverejnenia: 11.12.2000
(86) Číslo PCT:

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.7 :

C 12N 15/11
C 12N 15/77
C 12P 13/08

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

(72) Pôvodca vynálezu: Tilg Ivonne, Mettmann, DE;
Eggeling Lothar, Dr., Jülich, DE;
Eikmanns Bernhard, prof. Dr., Ulm, DE;
Sahm Hermann, prof., Jülich, DE;
Möckel Bettina, Dr., Bielefeld, DE;

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

(54) Názov prihlášky vynálezu: Spôsob fermentačnej výroby L-aminokyselín a nukleotidové sekvencie kódujúce gén accDA

(57) Anotácia:
Sú opísané nukleotidové sekvencie kódujúce gén accDA a spôsob fermentačnej výroby L-aminokyselín, najmä L-lyzínu, použitím koryneformných baktérií, v ktorých sa zosilňuje gén accDA.

01-920-00-če

Spôsob fermentačnej výroby L-aminokyselín a nukleotidové sekvencie kódujúce gén *accDA*

Oblasť techniky

Predmetom vynálezu sú nukleotidové sekvencie kódujúce gén *accDA* a spôsob fermentačnej výroby L-aminokyselín, najmä L-lyzínu, použitím koryneformných baktérií, v ktorých sa zosilňuje gén *accDA*.

Doterajší stav techniky

L-Aminokyseliny, najmä L-lyzín, sa používajú vo výžive zvierat, v humánnej medicíne a vo farmaceutickom priemysle.

Je známe, že tieto aminokyseliny sa vyrábajú fermentáciou kmeňov koryneformných baktérií, najmä *Corynebacterium glutamicum*. Kvôli veľkému významu sa stále pracuje na zlepšení spôsobu výroby. Zlepšenia spôsobov sa môžu dokonca týkať fermentačno-technologických opatrení, ako napríklad miešania a zásobovania kyslíkom, alebo zloženia živných médií, ako napríklad koncentrácie cukru počas fermentácie, alebo spracovania na produktovú formu napríklad ionexovou chromatografiou alebo vlastných úžitkových vlastností mikroorganizmu.

Na zlepšenie úžitkových vlastností týchto mikroorganizmov sa používajú metódy mutagenézy, selekcie a voľby mutantov. Týmto spôsobom sa získajú kmene, ktoré sú rezistentné voči antimetabolitom, ako je napríklad analogón lyzínu S-(2-

aminoetyl)cysteín, alebo sú auxotrofné pre regulačne významné aminokyseliny a produkujú L-aminokyseliny.

Už niekoľko rokov sa taktiež používajú metódy rekombinantnej techniky DNA na kmeňové zlepšenie kmeňov *Corynebacterium*, produkujúcich L-aminokyseliny, tým, že jednotlivé gény biosyntézy aminokyselín sa amplifikujú a skúma sa účinok na produkciu L-lyzínu. Prehľadný článok k tomu sa nachádza medzi iným v Kinoshita („Glutamic Acid Bacteria“, v: *Biology of Industrial Microorganisms*, Demain and Solomon (vyd.), Benjamin Cummings, Londýn, Veľká Británia, 1985, 115-142), Hilliger (*BioTec* 2, 40-44 (1991), Eggeling (*Amino Acids* 6:261-272 (1994)), Jetten a Sinskey (*Critical Reviews in Biotechnology* 15, 73-103 (1995)) a Sahm et al. (*Annals of the New York Academy of Science* 782, 25-39 (1996)).

Enzým acetyl-CoA-karboxyláza katalyzuje karboxyláciu acetyl-CoA na malonyl-CoA. Tento enzým z *Escherichia coli* sa skladá zo štyroch podjednotiek. Gén *accB* kóduje nosný proteín biotínkarboxylu, gén *accC* pre biotínkarboxylázu a gény *accA* a *accD* pre transkarboxylázu (Cronan and Rock, *Biosynthesis of Membrane lipids*. In: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium* (vyd. F. C. Neidhardt), 1996, str. 612-636, American Society for Microbiology). Kvôli tomu, že tento enzým má tú vlastnosť, že karboxyluje acylové skupiny vo forme acyl-CoA, označuje sa aj ako acyl-CoA-karboxyláza.

Nukleotidovú sekvenciu génu *accBC* *Corynebacterium glutamicum* určil Jäger et al. (*Archives of Microbiology* 166, 76-82 (1996)) a všeobecne je dostupná v databáze European Molecular Biologies Laboratories (EMBL, Heidelberg, Nemecko) pod prírastkovým číslom U35023. Gén *accBC* kóduje podjednotku

acetyl-CoA-karboxylázy, ktorá nesie doménu nosného proteínu biotínkarboxylu a doménu biotínkarboxylázy.

Vynálezcovia si stanovili za úlohu poskytnúť nové opatrenia na zlepšenú fermentačnú výrobu L-aminokyselín, najmä L-lyzínu.

Podstata vynálezu

L-Aminokyseliny sa používajú vo výžive zvierat, v ľudskej medicíne a vo farmaceutickom priemysle. Existuje preto všeobecný záujem o poskytnutie nových zlepšených spôsobov výroby L-aminokyselín.

Keď sa v nasledovnom texte uvedie L-lyzín alebo lyzín, mienia sa tým nielen zásady, ale aj soli, ako napríklad lyzínmonohydrochlorid alebo lyzínsulfát.

Predmetom vynálezu je DNA replikovateľná v koryneformných mikroorganizmoch, prednostne rekombinantná, pochádzajúca z *Corynebacterium*, ktorá obsahuje aspoň tú nukleotidovú sekvenciu, ktorá kóduje gén accDA, znázornený v SEQ-ID-No. 1.

Predmetom je aj replikovateľná DNA podľa nároku 1 s:

- (i) nukleotidovou sekvenciou znázornenou v SEQ-ID-No. 1,
- (ii) aspoň jednou sekvenciou, ktorá zodpovedá sekvencii (i) vnútri oblasti degenerácie genetického kódu, alebo
- (iii) aspoň jednou sekvenciou, ktorá sa hybridizuje so sekvenciou komplementárnou k sekvencii (i) alebo (ii), a

poprípade

(iv) funkčne neutrálnymi mutáciami so zmyslom v (i).

Predmetom vynálezu sú aj koryneformné mikroorganizmy, najmä rodu *Corynebacterium*, transformované zavedením uvedenej replikovateľnej DNA.

Vynález sa ďalej týka spôsobu fermentačnej výroby L-aminokyselín použitím koryneformných baktérií, ktoré najmä už produkujú aminokyseliny a v ktorých sa zosilňujú, najmä nadmerne exprimujú nukleotidové sekvencie kódujúce gén *accDA*.

Predmetom vynálezu je napokon aj spôsob zosilnenia acyl-CoA-karboxylázy v koryneformných baktériách pomocou spoločnej nadmernej expresie nového génu *accDA* podľa vynálezu a známeho génu *accBC*.

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

Mikroorganizmy, ktoré sú predmetom predloženého vynálezu, môžu vytvárať L-aminokyseliny z glukózy, sacharózy, laktózy, fruktózy, maltózy, melasy, škrobu, celulózy alebo z glycerolu a etanolu. Môže sa jednať o zástupcov koryneformných baktérií, najmä rodu *Corynebacterium*. Pri rode *Corynebacterium* je treba uviesť najmä druh *Corynebacterium gluta-*

micum, ktorý je v odbornom svete známy pre svoju schopnosť produkovať L-aminokyseliny.

Vhodnými kmeňmi rodu *Corynebacterium*, najmä druhu *Corynebacterium glutamicum*, sú známe kmene divého typu

Corynebacterium glutamicum ATCC13032,
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806,
Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870,
Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539,
Brevibacterium flavum ATCC14067,
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 a
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

a z nich vytvorené mutanty, poprípade kmene, produkujúce L-aminokyseliny, ako napríklad

Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709,
Brevibacterium flavum FERM-P 1708,
Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712,
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463 a
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464.

Vynálezcom sa podarilo izolovať nový gén *accDA* *C. glutamicum*. Na izoláciu génu *accDA* alebo aj iných génov *C. glutamicum* sa najskôr založí génová banka tohto mikroorganizmu v *E. coli*. Založenie génových bánk je opísané vo všeobecne známych učebniciach a príručkách. Ako príklad možno uviesť učebnicu od Winnackera: *Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie* (Verlag Chemie, Weinheim, Nemec-ko, 1990) alebo príručku od Sambrooka et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Veľmi známou génovou bankou je génová banka

kmeňa W3110 *E. coli* K-12, ktorú založili Kohara et al. (Cell 50, 495 - 508 (1987)) v λ -vektoroch. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) opisujú génovú banku *C. glutamicum* ATCC13032, ktorá bola založená pomocou kozmidového vaktora SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) v kmeni NM554 *E. coli* K12 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575). Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326) zasa opisujú génovú banku *C. glutamicum* ATCC13032 s použitím kozmidu pHC79 (Hohn a Collins, Gene 11, 291-298 (1980)). Na vytvorenie génovej banky *C. glutamicum* v *E. coli* sa môžu použiť aj plazmidy, ako napríklad pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979) alebo pUC9 (Viera et al., 1982, Gene, 19:259-268). Ako hostitelia sú vhodné najmä také kmene *E. coli*, ktoré sú defektné vzhľadom na restrikciu a rekombináciu. Príkladom toho je kmeň DH5 α mc r , ktorý opísal Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649). Dlhé fragmenty DNA klonované pomocou kozmidov sa potom zasa môžu subklonovať do bežných vektorov vhodných na sekvencovanie a potom sekvencovať, ako sa opisuje napríklad v Sanger et al. (Proceedings of the National of Sciences of the United States of America 74:5463-5467 (1977)).

Týmto spôsobom sa získala nová, sekvencia DNA *C. glutamicum*, kódujúca gén *accDA*, ktorá je ako SEQ ID NO 1 súčasťou predloženého vynálezu. V SEQ ID NO 2 je reprodukováaná kódujúca oblasť (*cds*) génu *accDA*. Ďalej sa z predloženej sekvencie DNA odvodila aminokyselinová sekvencia príslušného proteínu pomocou vyššie opísaných metód. V SEQ ID NO 3 je znázornená vyplývajúca aminokyselinová sekvencia génového produktu *accDA*.

Kódujúce sekvencie DNA, ktoré vyplývajú z SEQ ID NO 1 v dôsledku degenerovateľnosti genetického kódu, sú taktiež súčasťou vynálezu. Rovnako sú súčasťou vynálezu sekvencie DNA, ktoré sa hybridizujú s SEQ ID NO 1 alebo časťami SEQ ID NO 1. V odbornom svete sú ďalej konzervatívne výmeny aminokyselín, ako napríklad výmena glycínu za alanín alebo kyseliny asparágovej za kyselinu glutámovú v proteínoch, známe ako „mutácie so zmyslom“ (sense mutations), ktoré nevedú k žiadnej zásadnej zmene aktivity proteínu, t. zn. sú funkčne neutrálne. Ďalej je známe, že zmeny na N-konci a/alebo C-konci proteínu nemôžu jeho funkciu podstatne poškodzovať alebo ju môžu dokonca stabilizovať. Údaje k tomu nájde odborník medzi iným v Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), v O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), v Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), v Hochuli et al. (Bio(Technology 6:1321-1325 (1988)) a v známych učebniciach genetiky a molekulovej biológie. Aminokyselinové sekvencie, ktoré vyplývajú príslušným spôsobom z SEQ ID NO 3, sú taktiež súčasťou vynálezu.

Vynálezcovia zistili, že koryneformné baktérie po nadmernej expresii génu accDA produkujú zlepšeným spôsobom L-lyzín.

Na dosiahnutie nadmernej expresie sa môže zvýšiť počet kópií príslušných génov alebo sa môže mutovať promótorová a regulačná oblasť alebo miesto naviazania ribozómov, ktoré sa nachádza proti smeru štruktúrneho génu. Rovnakým spôsobom pôsobia expresívne kazety, ktoré sa vkladajú proti smeru štruktúrneho génu. Pomocou indukovateľných promótorov možno dodatočne zvýšiť expresiu v priebehu fermentačnej produkcie L-lyzínu. Opatreniami na predĺženie trvanlivosti m-RNA sa expresia taktiež zlepšuje. Ďalej sa enzýmová aktivita tak-

tiež zosilňuje zabránením odbúravania enzýmového proteínu. Gény alebo génové konštrukty môžu byť existovať v plazmidoch s rozličným počtom kópií, alebo môžu byť integrované a amplifikované v chromozóme. Ďalej sa môže alternatívne dosiahnuť nadmerná expresia príslušných génov zmenou zloženia médií a zmenou uskutočnenia kultivácie.

Návody na to nájde odborník medzi iným v Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), v Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya a Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), v Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), v európskom patentovom spise EPS 0 472 869, v US patente 4,601,893, vo Schwarzer a Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), v Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), v LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), v patentovej prihláške WO 96/15246, v Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), v japonskom zverejnenom spise JP-A-10-229891, v Jensen a Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), v Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) a v známych učebniciach genetiky a molekulovej biológie.

Príkladom plazmidu, pomocou ktorého sa môže nadmerne exprimovať gén *accDA*, je pZ1accDA (obrázok 1), ktorý sa nachádza v kmeni MH20-22B/pZ1accDA. Plazmid pZ1accDA je kyvadlovým vektorom *E. coli* - *C. glutamicum* spočívajúcim na plazmide pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology 55(3), 684-688 (1989)), ktorý nesie gén *accDA*. Rovnako sa môžu použiť iné plazmidové vektory replikovateľné v *C. glutamicum*, ako napríklad pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) alebo pZ8-1 (európsky patentový spis 0 375 889).

Vynálezcovia ďalej zistili, že pomocou prídavnej nadmernej expresie známeho génu *accBC* prídavne k novému génu *accDA* podľa vynálezu produkujú koryneformné baktérie zlepšeným spôsobom acyl-CoA-karboxylázu. Príkladom plazmidu, pomocou ktorého sa môže spoločne nadmerne exprimovať gén *accDA* a gén *accBC*, je *pEK0accBCaccDA* (obrázok 2). Plazmid *pEK0accBCaccDA* je kyvadlovým vektorom *E. coli* - *C. glutamicum*, spočívajúcim na plazmide *pEK0* (Eikmanns et al., Gene 102, 93-98, (1991)), ktorý nesie gén *accBC* a *accDA*. Rovnako sa môžu použiť iné plazmidové vektory replikovateľné v *C. glutamicum*, ako napríklad *pEKEx1* (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) alebo *pZ8-1* (európsky patentový spis 0 375 889).

Dodatočne môže byť pre produkciu L-aminokyselín výhodné okrem génu *accDA* nadmerne exprimovať jeden alebo viac enzýmov príslušnej biosyntetickej dráhy. Takto sa napríklad môže pri produkcii L-lyzínu

- súčasne nadmerne exprimovať gén *dapA* kódujúci dihydrodipikolinátsyntázu (EP-B 0 197 335), alebo
- súčasne amplifikovať fragment DNA sprostredkovávajúci rezistenciu na S-(2-aminoetyl)-cysteín (EP-A 0 088 166).

Ďalej môže byť pre produkciu L-aminokyselín, najmä L-lyzínu, výhodné okrem nadmernej expresie génu *accDA* vylúčiť nežiaduce vedľajšie reakcie (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms“, v: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (vyd.), Academic Press, Londýn, Veľká Británia, 1982).

Mikroorganizmy vyrobené podľa vynálezu sa môžu na účely produkcie L-lyzínu kultivovať kontinuálne alebo diskontinuálne spôsobom batch (vsádzková kultivácia) alebo spôsobom fed batch (prítokový systém) alebo repeated fed batch spôsobom (opakovaný prítokový systém). Zhrnutie známych kultivačných metód je opísané v učebnici od Chmiela (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991) alebo v učebnici od Storhasa (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994).

Použité kultivačné médium musí vhodným spôsobom vyhovovať nárokom daných kmeňov. Opisy kultivačných médií rozličných mikroorganizmov sa nachádzajú v príručke „Manual of Methods for General Bacteriology“ od American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981). Ako zdroje uhlíka sa môžu používať cukry a sacharidy, ako je napríklad glukóza, sacharóza, laktóza, fruktóza, maltóza, melasa, škrob a celulóza; oleje a tuky, ako napríklad sójový olej, slnečnicový olej, podzemnicový olej a kokosový olej, mastné kyseliny, ako je kyselina palmitová, kyselina stearová, kyselina linolová; alkoholy, ako je napríklad glycerol a etanol; a organické kyseliny, ako je napríklad kyselina octová. Tieto látky sa môžu používať ako jednotlivé zložky alebo ako zmes. Ako zdroje dusíka sa môžu používať organické zlúčeniny obsahujúce dusík, napríklad peptóny, kvasnicový extrakt, mäsový extrakt, sladový extrakt, máčacia voda, sójová múka a močovina, alebo anorganické zlúčeniny, ako je napríklad síran amónny, chlorid amónny, fosforečnan amónny, uhličitan amónny a dusičnan amónny. Zdroje dusíka sa môžu používať jednotlivo alebo ako zmes. Ako zdroje fosforu sa môžu používať kyselina fosforečná, dihydrogenfosforečnan draselný alebo hydrogenfosforečnan draselný alebo príslušné soli obsahujúce sodík.

Kultivačné médium musí ďalej obsahovať soli kovov, ako napríklad síran horečnatý alebo síran železa, ktoré sú potrebné na rast. Napokon sa môžu dodatočne k vyššie uvedeným látkam používať esenciálne rastové látky, ako sú aminokyseliny a vitamíny. Ku kultivačnému médiu sa môžu okrem toho pridávať vhodné prekurzory. Uvedené používané suroviny sa môžu ku kultúre pridávať vo forme jednorazovej vsádzky alebo sa môžu vhodným spôsobom pridávať počas kultivácie.

Na kontrolu pH kultúry sa vhodne používajú zásadité zlúčeniny, ako je hydroxid sodný, hydroxid draselný, amoniak, poprípade amoniaková voda, alebo kyslé zlúčeniny, ako je kyselina fosforečná alebo kyselina sírová. Na kontrolu tvorby peny sa môžu používať odpeňovadlá, ako napríklad polyglykolestery mastných kyselín. Na udržiavanie stability plazmidov sa môžu k médiu pridávať vhodné selektívne pôsobiacie látky, napríklad antibiotiká. Aby sa udržiavali aeróbne podmienky, zavádza sa do kultúry kyslík alebo zmesi obsahujúce kyslík, napríklad vzduch. Teplota kultúry je zvyčajne približne 20 °C až 45 °C a najmä približne 25 °C až 40 °C. Kultúra sa udržiava tak dlho, kým sa nevytvorí maximum žiadanej L-aminokyseliny. Tento cieľ sa zvyčajne dosiahne za 10 hodín až 160 hodín.

Analýza L-lyzínu sa môže uskutočňovať anexovou chromatografiou s následnou ninhydrínovou derivatizáciou tak, ako sa opisuje v Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958) 1190).

Nasledovné mikroorganizmy boli uložené v Nemeckej zbierke mikroorganizmov a bunkových kultúr (DSMZ, Braunschweig, Nemecko) podľa budapeštianskej zmluvy:

- kmeň *Corynebacterium glutamicum* DSM5715/pZ1accDA ako DSM 12785,
- kmeň *Corynebacterium glutamicum* DSM5715/pEK0accBCaccDA ako DSM 12787.

Spôsob podľa vynálezu slúži na fermentačnú výrobu L-aminokyselín, najmä kyseliny L-asparágovej, L-asparagínu, L-homoserínu, L-treonínu, L-izoleucínu a L-metionínu pomocou koryneformných baktérií, najmä na výrobu L-lyzínu.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Predložený vynález sa v nasledovnom texte bližšie vysvetľuje na základe príkladov uskutočnenia.

Príklad 1

Klonovanie a sekvencovanie génu accDA

Použitím kozmidu pHC79 (Hohn a Collins, Gene 11, 291-298 (1980) tak, ako sa opisuje aj v Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326)) sa vytvorila génová banka *C. glutamicum* ATCC13032.

Zvolený kozmid sa štiepil restriktčnými enzýmami EcoRI a XhoI podľa údajov výrobcu týchto restriktčných enzýmov (Boehringer Mannheim). Vzniknuté fragmenty DNA sa zmiešali s vektorom pUC18 (Norrande et al. (1983) Gene 26: 101-106), ktorý bol taktiež spracovaný restriktčnými enzýmami EcoRI a XhoI, a po spracovaní T4-DNA-ligázou sa klonovali do kmeňa DH5 α mc *E. coli* (Grant et al. (1990) Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87: 4645-4645) tak, ako

opisuje Sambrook et al. (Molecular Cloning a Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratories). Selekcia transformantov sa uskutočnila selekciou na agare LB obsahujúcom 50 µg/ml ampicilínu, ako sa opisuje v Sambrook et al. (Molecular Cloning a Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratories). Z jedného transformantu sa izolovala plazmidová DNA a označila ako pUCaccDA. Potom sa pomocou kitu (Erase-a-Base) od firmy Promega (Heidelberg, Nemecko), určeného na tento účel, vytvorili subklony štiepením exonukleázou III. Tieto sa sekvencovali podľa metódy dideoxyreťazcového prerušenia od Sangera et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA (1977) 74: 5463-5467). Pritom sa použil Auto-Read Sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Švédsko). Analýza pomocou gélovej elektroforézy sa uskutočnila pomocou automatického laserového fluorescenčného sekvenčného prístroja (A.L.F.) od Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Švédsko). Získaná nukleotidová sekvencia sa analyzovala pomocou programového balíka (Programmpaket) HUSAR (Release 4.0, EMBL, Heidelberg, Nemecko). Nukleotidová sekvencia je znázornená v SEQ ID NO 1. Analýza nukleotidovej sekvencie poskytla otvorený čítací raster s 1473 párami báz, ktorý sa označil ako gén accDA. Gén accDA z *C. glutamicum* kóduje polypeptid zo 484 aminokyselín.

Príklad 2

Expresia génu accDA v *Corynebacterium glutamicum*

Gén accDA sa kvôli expresii v *C. glutamicum* subklonoval do vektora pZ1 (Menkel et al. (1989) Applied and Environmental Microbiology 55: 684-688). Na to sa plazmid pUCaccDA (viď príklad 1)) štiepil restriktčným enzýmom ClaI. Výsledný fragmentt s veľkosťou 1,6 kb sa izoloval tak, ako sa opisu-

je v príklade 1, spracoval Klenowovou polymerázou a alkalickou fosfatázou a použil na ligáciu s pZ1. Tento vektor sa predtým linearizoval pomocou ScaI. Ligačnou násadou sa transformoval *E. coli* DH5 α mc (Grant et al. (1990) Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87: 4645-4645) a transformanty sa selektovali na agare LB obsahujúcom kanamycín (50 μ g/ml). Tým sa získal kyvadlový vektor pZ1accDA s veľkosťou 7,7 kb (obrázok 1). Tento sa pomocou elektroporácie zaviedol do kmeňa DSM5715 tak, ako sa opisuje v Haynes (FEMS Microbiol. Letters (1989) 61: 329-334), pričom transformanty sa selektovali na agare LBHIS (Liebl et al., FEMS Microbiology Letters 1989, 65: 299-304). Týmto spôsobom sa získal kmeň *C. glutamicum* DSM5715/pZ1accDA.

Príklad 3

Produkcia L-lyzínu kmeňom DSM5715/pZ1accDA

Kmeň DSM5715/pZ1accDA sa po predbežnej kultivácii v médiu CgIII (Keilhauer et al. 1993, Journal of Bacteriology 175: 5595-5603) kultivoval v produkčnom médiu CgXII (Keilhauer et al. 1993, Journal of Bacteriology 175: 5595-5603). Pridali sa 4 % glukózy a 50 mg/l kanamycínsulfátu.

Po 48 hodinách inkubácie sa stanovila optická hustota pri 660 nm a koncentrácia vytvoreného L-lyzínu. V tabuľke 1 je uvedený výsledok pokusu.

Tabuľka 1

Kmeň	Optická hustota	L-Lyzín g/l
DSM5715	31,4	7,2
DSM5715/pZlaccDA	43,1	8,0

Príklad 4

Spoločná expresia accBC a accDA

(i) Konštrukcia expresívneho vektora pEK0accBCaccDA

Plazmid pWJ71 obsahujúci accBC (Jäger et al., Archives of Microbiology (1996) 166:76-82)) sa štiepil restriktčnými enzýmami AgeI a SmaI a potom sa spracoval Klenowovou polymerázou a alkalickou fosfatázou. Paralelne k tomu sa štiepil plazmid pUCaccDA pomocou EcoRI/XhoI a potom sa uskutočnilo spracovanie Klenowovou polymerázou a alkalickou fosfatázou. Preparatívnu izoláciu z agarózového gélu, ktorá sa uskutočnila tak, ako sa opisuje v Sambrook et al. (Molecular Cloning a Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratories), sa izoloval fragment s veľkosťou 2,1 kb, nesúci accDA. Tento sa ligoval s vektorom pWJ71, ktorý bol pripravený tak, ako sa predtým opísalo. Z výsledného plazmidu sa pomocou štiepenia KpnI/SalI vyštiepil fragment s veľkosťou 4,6 kb nesúci accBCaccDA a znovu sa pomocou elektroforézy použitím agarózového gélu preparatívne izoloval. Na ligáciu tohto fragmentu s kyvadlovým vektorom pEK0 *C. glutamicum*/*E. coli* (Eeikmanns et al. (1991) Gene 102: 93-98) sa pEK0 štiepil restriktčnými enzýmami KpnI a SalI a potom sa uskutočnilo spracovanie Klenowovou polymerázou a alkalickou fosfatázou. Takto pripravený vektor sa ligoval s

fragmentom s veľkosťou 4,6 kb, nesúcim accBCaccDA. Výsledný vektor pEK0accBCaccDA je znázornený na obrázku 2. Tento vektor sa pomocou elektroporácie (Haynes 1989, FEMS Microbiol. Letters 61: 329-334) vložil do kmeňa ATCC13032 tak, ako sa opisuje v príklade 2. Týmto spôsobom sa získal kmeň *C. glutamicum* ATCC13032/pEK0accBCaccDA.

(ii) Stanovenie acyl-CoA-karboxylázovej aktivity

Kmeň *C. glutamicum* ATCC13032/pEK0accBCaccDA sa po predbežnej kultivácii v médiu CGIII (Keilhauer et al. 1993, Journal of Bacteriology 175: 5595-5603) naniesol na médium CGXII, ktoré je opísané v Keilhauer et al. (Journal of Bacteriology (1993) 175: 5595-5603). Bunky sa zhromaždili centrifugáciou a peleta buniek sa raz premyla 60 mM Tris-HCl (pH 7,2) a resuspendovala v tom istom tlmivom roztoku. Drvenie buniek sa uskutočnilo pomocou 10-minútového spracovania ultrazvukom (Branson-Sonifier W-250, Branson Sonic Power Co, Danbury, USA). Potom sa úlomky buniek oddelili 30-minútovou centrifugáciou pri 4 °C a supernatant sa ako surový produkt použil v enzýmovom teste. Reakčná násada enzýmového testu obsahovala v 1 ml reakčného objemu 60 mM Tris-HCl (pH 7,2), 65 mM KHCO₃, 1 mM ATP, 1,5 mM MgCl₂, 4 mM AcylCoA (voliteľne acetyl-CoA alebo propionyl-CoA) a 4 mg surového extraktu. Testovacie násady sa inkubovali pri 30 °C a po 15, 30, 45 a 60 sekundách sa odobrali 100µl vzorky a stanovila sa v nich koncentrácia malonyl-CoA, poprípade metylmalonyl-CoA pomocou HPLC-analýzy (Kimura et al. (1997) Journal of Bacteriology 179: 7098-7102). Ako ukazuje tabuľka 2, kmeň *C. glutamicum* ATCC13032/pEK0accBCaccDA vykazuje vysokú acyl-CoA-karboxylázovú aktivitu s acetyl-CoA aj s propionyl-CoA, naproti čomu kontrolný kmeň má len nízku

acyl-CoA-karboxylázovou aktivitu s acetyl-CoA aj s propionyl-CoA.

Tabuľka 2: Špecifická acyl-CoA-karboxylázová aktivita ($\mu\text{mol}/\text{min}$ a mg proteínu) v *C. glutamicum*

Kmeň	Acyl-CoA-karboxylázová aktivita so substrátom	
	Acetyl-CoA	Propionyl-CoA
ATCC13032/pEK0accBCaccDA	0,048	0,124
ATCC13032/pEK0	0,011	0,018

Prehľad obrázkov na výkresoch

Priložené sú nasledovné obrázky:

Obrázok 1: Mapa plazmidu pZlaccDA

Obrázok 2: Mapa plazmidu pEK0accBCaccDA

SEKVENČNÝ PROTOKOL

<110> Degussa-Hüls AG
 Forschungszentrum-Jülich GmbH

5

<120> Spôsob fermentačnej výroby L-aminokyselín a nukleotidové
 sekvencie kódujúce gén accDA

<130> 990042BT

10

<140>
 <141>

<160> 3

15

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
 <211> 2123

20 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <221> gény

25 <222> (508)..(1980)
 <223> accDA

<400> 1

ctcgagcggg agtcggtgat cggccactct ctaagcaatg ccggctttaa aataaagcaa 60

30 cttatatggtt tctcaccaca tctggccgac gaccacgaag tatgttgtcg atcacagcta 120

aacgtgtgaa tgtgaagtta cctaactcac attgcaatgc gatagcgatt tggaaaactc 180

35 actccccca atatcttaac ttaaacttaa aagtagtggt ttacctgcat ttataaaagt 240

tccgatcta cccctcttt accccgaaat accccttttg caaagattgc aacacaaca 300

gtgcaatagt taacgggctt cacacgtcac cattctgtcc ggtttttaggc tatggtcggg 360

40 acgtctaggc aaaaagtagt tttgtgagat gaaacgcata atccgctatt ttttacgcaa 420

tcgatagcct aaattgggct tagatcttcc gcctctaat aggtatgcag agacattcga 480
 attaattaac aaagccattt ttcggccgtg gagaagcgtt ttccgactat ggtgtggggc 540
 5 atggaacaca cttcagcatt gacgctcata gactcggttt tggaccctga cagcttcatt 600
 tcttggaatg aaactcccca atatgacaac ctcaatcaag gctatgcaga gaccttggag 660
 cgggctcgaa gcaaggccaa atgcatgaa tcgtaatta ctggagaagg caccgtggag 720
 10 ggcattccgg tagccgttat tttgtccgat tttccttcc tcggcggttc tttgggcacg 780
 gtcgctcgg tgcgcatcat gaaggcgatt caccgcgcca cagagctgaa actcccactg 840
 15 ctggtctccc ctgcttccgg tgggtgcgcg atgcaggaag acaatcgagc ttttgtcatg 900
 atggtgtcca taaccgcggc tgtgcagcgt caccgcgagg cgcatttgcc gttcctggtg 960
 tatttgcgca atcccacgat ggggtggcgcc atggcctcgt ggggttcac tgggcatctc 1020
 20 acttttgcgg aaccggcgcc gcagataggt ttctgggtc ctcgctggtt ggagttaacc 1080
 actgggcatg cgcttccaga cgggtgtcag caggcggaga atttggtgaa aactggtgtg 1140
 25 attgatggaa ttgtgtcgcc actccaattg cgtgcagcgg tggcaaaaac cctcaaggtt 1200
 attcagccgg tagaggcaac ggatcgtttt tctccaacia ctctggcgtt ggcacttccg 1260
 gtgatggagg cgattgcgcg ttctcgtgac ccgagagggc ctggaatcgg ggagattatg 1320
 30 gaaacgttgg gggcagacgt cgtcaagctt tctggtgcgc gtgctggcgc attgagcccc 1380
 gctgtgcgcg ttgccctggc gcgcatcggg ggccggcccc tgggtctgat tgggcaggat 1440
 35 cgccgcttca cgcttgggcc gcaggagctg cgttttgcgc gtcgtggcat ttcgctggcg 1500
 cgcgagctaa acctgccgat cgtgtccatc atcgacacct ccggcgccga attgtcgcag 1560
 ggggctgagg agctcggcat cgcaagctcg attgcgcgca cttgtccaa gcttatcgac 1620
 40 gctcccctcc ccaccgtttc ggtcattatt ggtcagggcg ttggcgggtg cgcgctggcc 1680

atgctgcccg cggatctggt ctacgcggcc gaaaacgcgt ggctgtccgc attgccacca 1740
gagggcgcct cggccatcct cttccgcgac accaaccacg ccgcggaat catagagcga 1800
5 caaggcgtgc aggcgcacgc actttaagc caaggccta tcgacgggat cgtcgccgaa 1860
accgagcact ttgttgaaga aattctcggc acaatcagca acgocctctc cgaattggat 1920
aacaatccgg agagggcggg acgcgacagt cgcttcacac gatttgagcg tttagcgcag 1980
10 taaagaaaat tatgcgctga tcaaatcgat gatgaacacc agggtagcgc cagacagtgg 2040
gtggccgaa ccctcagggc cgtaagcagc ctctggcgga atggtcagct gacgacgtcc 2100
15 gccgaccttc atgcctggaa ttc 2123

<210> 2

<211> 1473

20 <212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>

<221> CDS

25 <222> (1)..(1473)

<223> accDA

<400> 2

gtg gag aag cgt ttt ccg act atg gtg tgg ggc atg gaa cac act tca 48
 Val Glu Lys Arg Phe Pro Thr Met Val Trp Gly Met Glu His Thr Ser
 1 5 10 15

5
 gca ttg acg ctc ata gac tcg gtt ttg gac cct gac agc ttc att tct 96
 Ala Leu Thr Leu Ile Asp Ser Val Leu Asp Pro Asp Ser Phe Ile Ser
 20 25 30

10
 tgg aat gaa act ccc caa tat gac aac ctc aat caa ggc tat gca gag 144
 Trp Asn Glu Thr Pro Gln Tyr Asp Asn Leu Asn Gln Gly Tyr Ala Glu
 35 40 45

15
 acc ttg gag cgg gct cga agc aag gcc aaa tgc gat gaa tcg gta att 192
 Thr Leu Glu Arg Ala Arg Ser Lys Ala Lys Cys Asp Glu Ser Val Ile
 50 55 60

20
 act gga gaa ggc acc gtg gag ggc att ccg gta gcc gtt att ttg tcc 240
 Thr Gly Glu Gly Thr Val Glu Gly Ile Pro Val Ala Val Ile Leu Ser
 65 70 75 80

25
 gat ttt tcc ttc ctc ggc ggt tct ttg ggc acg gtc gcg tcg gtg cgc 288
 Asp Phe Ser Phe Leu Gly Gly Ser Leu Gly Thr Val Ala Ser Val Arg
 85 90 95

30
 atc atg aag gcg att cac cgc gcc aca gag ctg aaa ctc cca ctg ctg 336
 Ile Met Lys Ala Ile His Arg Ala Thr Glu Leu Lys Leu Pro Leu Leu
 100 105 110

35
 gtc tcc cct gct tcc ggt ggt gcg cgc atg cag gaa gac aat cga gct 384
 Val Ser Pro Ala Ser Gly Gly Ala Arg Met Gln Glu Asp Asn Arg Ala
 115 120 125

40
 ttt gtc atg atg gtg tcc ata acc gcg gct gtg cag cgt cac cgc gag 432
 Phe Val Met Met Val Ser Ile Thr Ala Ala Val Gln Arg His Arg Glu
 130 135 140

	gcg cat ttg ccg ttc ctg gtg tat ttg cgc aat ccc acg atg ggt ggc	480
	Ala His Leu Pro Phe Leu Val Tyr Leu Arg Asn Pro Thr Met Gly Gly	
	145	150
		155
		160
5	gcc atg gcc tcg tgg ggt tca tct ggg cat ctc act ttt gcg gaa ccc	528
	Ala Met Ala Ser Trp Gly Ser Ser Gly His Leu Thr Phe Ala Glu Pro	
		165
		170
		175
10	ggc gcg cag ata ggt ttc ctg ggt cct cgc gtg gtg gag tta acc act	576
	Gly Ala Gln Ile Gly Phe Leu Gly Pro Arg Val Val Glu Leu Thr Thr	
		180
		185
		190
15	ggg cat gcg ctt cca gac ggt gtg cag cag gcg gag aat ttg gtg aaa	624
	Gly His Ala Leu Pro Asp Gly Val Gln Gln Ala Glu Asn Leu Val Lys	
		195
		200
		205
20	act ggt gtg att gat gga att gtg tcg cca ctc caa ttg cgt gca gcg	672
	Thr Gly Val Ile Asp Gly Ile Val Ser Pro Leu Gln Leu Arg Ala Ala	
		210
		215
		220
25	gtg gca aaa acc ctc aag gtt att cag ccg gta gag gca acg gat cgt	720
	Val Ala Lys Thr Leu Lys Val Ile Gln Pro Val Glu Ala Thr Asp Arg	
		225
		230
		235
		240
25	ttt tct cca aca act cct ggc gtg gca ctt ccg gtg atg gag gcg att	768
	Phe Ser Pro Thr Thr Pro Gly Val Ala Leu Pro Val Met Glu Ala Ile	
		245
		250
		255
30	gcg cgt tct cgt gac ccg cag agg cct gga atc ggg gag att atg gaa	816
	Ala Arg Ser Arg Asp Pro Gln Arg Pro Gly Ile Gly Glu Ile Met Glu	
		260
		265
		270
35	acg ttg ggg gca gac gtc gtc aag ctt tct ggt gcg cgt gct ggc gca	864
	Thr Leu Gly Ala Asp Val Val Lys Leu Ser Gly Ala Arg Ala Gly Ala	
		275
		280
		285

	ttg agc ccg gct gtg cgc gtt gcc ctg gcg cgc atc ggg ggc cgg ccc	912
	Leu Ser Pro Ala Val Arg Val Ala Leu Ala Arg Ile Gly Gly Arg Pro	
	290 295 300	
5	gtg gtg ctg att ggg cag gat cgc cgc ttc acg ctt ggg ccg cag gag	960
	Val Val Leu Ile Gly Gln Asp Arg Arg Phe Thr Leu Gly Pro Gln Glu	
	305 310 315 320	
	ctg cgt ttt gcg cgt cgt ggc att tcg ctg gcg cgc gag cta aac ctg	1008
10	Leu Arg Phe Ala Arg Arg Gly Ile Ser Leu Ala Arg Glu Leu Asn Leu	
	325 330 335	
	ccg atc gtg tcc atc atc gac acc tcc ggc gcc gaa ttg tcg cag gcg	1056
	Pro Ile Val Ser Ile Ile Asp Thr Ser Gly Ala Glu Leu Ser Gln Ala	
15	340 345 350	
	gct gag gag ctc ggc atc gca agc tcg att gcg cgc acc ttg tcc aag	1104
	Ala Glu Glu Leu Gly Ile Ala Ser Ser Ile Ala Arg Thr Leu Ser Lys	
	355 360 365	
20	ctt atc gac gct ccc ctc ccc acc gtt tcg gtc att att ggt cag ggc	1152
	Leu Ile Asp Ala Pro Leu Pro Thr Val Ser Val Ile Ile Gly Gln Gly	
	370 375 380	
25	gtt ggc ggt ggc gcg ctg gcc atg ctg ccc gcc gat ctg gtc tac gcg	1200
	Val Gly Gly Gly Ala Leu Ala Met Leu Pro Ala Asp Leu Val Tyr Ala	
	385 390 395 400	
	gcc gaa aac gcg tgg ctg tcc gca ttg cca cca gag ggc gcc tcg gcc	1248
30	Ala Glu Asn Ala Trp Leu Ser Ala Leu Pro Pro Glu Gly Ala Ser Ala	
	405 410 415	
	atc ctc ttc cgc gac acc aac cac gcc gcg gaa atc ata gag cga caa	1296
	Ile Leu Phe Arg Asp Thr Asn His Ala Ala Glu Ile Ile Glu Arg Gln	
35	420 425 430	

ggc gtg cag gcg cac gca ctt tta agc caa ggg ctt atc gac ggg atc 1344
 Gly Val Gln Ala His Ala Leu Leu Ser Gln Gly Leu Ile Asp Gly Ile
 435 440 445

5 gtc gcc gaa acc gag cac ttt gtt gaa gaa att ctc ggc aca atc agc 1392
 Val Ala Glu Thr Glu His Phe Val Glu Glu Ile Leu Gly Thr Ile Ser
 450 455 460

aac gcc ctc tcc gaa ttg gat aac aat ccg gag agg gcg gga cgc gac 1440
 10 Asn Ala Leu Ser Glu Leu Asp Asn Asn Pro Glu Arg Ala Gly Arg Asp
 465 470 475 480

agt cgc ttc aca cga ttt gag cgt tta gcg cag 1473
 Ser Arg Phe Thr Arg Phe Glu Arg Leu Ala Gln
 15 485 490

<210> 3
 <211> 491
 20 <212> PRT
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 3
 Val Glu Lys Arg Phe Pro Thr Met Val Trp Gly Met Glu His Thr Ser
 25 1 5 10 15

Ala Leu Thr Leu Ile Asp Ser Val Leu Asp Pro Asp Ser Phe Ile Ser
 20 25 30

30 Trp Asn Glu Thr Pro Gln Tyr Asp Asn Leu Asn Gln Gly Tyr Ala Glu
 35 40 45

Thr Leu Glu Arg Ala Arg Ser Lys Ala Lys Cys Asp Glu Ser Val Ile
 50 55 60

35 Thr Gly Glu Gly Thr Val Glu Gly Ile Pro Val Ala Val Ile Leu Ser
 65 70 75 80

Asp Phe Ser Phe Leu Gly Gly Ser Leu Gly Thr Val Ala Ser Val Arg
 40 85 90 95

Ile Met Lys Ala Ile His Arg Ala Thr Glu Leu Lys Leu Pro Leu Leu
 100 105 110

5 Val Ser Pro Ala Ser Gly Gly Ala Arg Met Gln Glu Asp Asn Arg Ala
 115 120 125

Phe Val Met Met Val Ser Ile Thr Ala Ala Val Gln Arg His Arg Glu
 130 135 140

10 Ala His Leu Pro Phe Leu Val Tyr Leu Arg Asn Pro Thr Met Gly Gly
 145 150 155 160

Ala Met Ala Ser Trp Gly Ser Ser Gly His Leu Thr Phe Ala Glu Pro
 15 165 170 175

Gly Ala Gln Ile Gly Phe Leu Gly Pro Arg Val Val Glu Leu Thr Thr
 180 185 190

20 Gly His Ala Leu Pro Asp Gly Val Gln Gln Ala Glu Asn Leu Val Lys
 195 200 205

Thr Gly Val Ile Asp Gly Ile Val Ser Pro Leu Gln Leu Arg Ala Ala
 210 215 220

25 Val Ala Lys Thr Leu Lys Val Ile Gln Pro Val Glu Ala Thr Asp Arg
 225 230 235 240

Phe Ser Pro Thr Thr Pro Gly Val Ala Leu Pro Val Met Glu Ala Ile
 30 245 250 255

Ala Arg Ser Arg Asp Pro Gln Arg Pro Gly Ile Gly Glu Ile Met Glu
 260 265 270

35 Thr Leu Gly Ala Asp Val Val Lys Leu Ser Gly Ala Arg Ala Gly Ala
 275 280 285

Leu Ser Pro Ala Val Arg Val Ala Leu Ala Arg Ile Gly Gly Arg Pro
 290 295 300

40 Val Val Leu Ile Gly Gln Asp Arg Arg Phe Thr Leu Gly Pro Gln Glu
 305 310 315 320

Leu Arg Phe Ala Arg Arg Gly Ile Ser Leu Ala Arg Glu Leu Asn Leu
 325 330 335

5 Pro Ile Val Ser Ile Ile Asp Thr Ser Gly Ala Glu Leu Ser Gln Ala
 340 345 350

Ala Glu Glu Leu Gly Ile Ala Ser Ser Ile Ala Arg Thr Leu Ser Lys
 355 360 365

10 Leu Ile Asp Ala Pro Leu Pro Thr Val Ser Val Ile Ile Gly Gln Gly
 370 375 380

Val Gly Gly Gly Ala Leu Ala Met Leu Pro Ala Asp Leu Val Tyr Ala
 15 385 390 395 400

Ala Glu Asn Ala Trp Leu Ser Ala Leu Pro Pro Glu Gly Ala Ser Ala
 405 410 415

20 Ile Leu Phe Arg Asp Thr Asn His Ala Ala Glu Ile Ile Glu Arg Gln
 420 425 430

Gly Val Gln Ala His Ala Leu Leu Ser Gln Gly Leu Ile Asp Gly Ile
 435 440 445

25 Val Ala Glu Thr Glu His Phe Val Glu Glu Ile Leu Gly Thr Ile Ser
 450 455 460

Asn Ala Leu Ser Glu Leu Asp Asn Asn Pro Glu Arg Ala Gly Arg Asp
 30 465 470 475 480

Ser Arg Phe Thr Arg Phe Glu Arg Leu Ala Gln
 485 490

35

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. DNA replikovateľná v koryneformných mikroorganizmoch, prednostne rekombinantná, pochádzajúca z *Corynebacterium*, ktorá obsahuje aspoň tú nukleotidovú sekvenciu, ktorá kóduje gén accDA, znázornený v SEQ-ID-No. 1.

2. Replikovateľná DNA podľa nároku 1 s:

(i) nukleotidovou sekvenciou znázornenou v SEQ-ID-No. 1,

(ii) aspoň jednou sekvenciou, ktorá zodpovedá sekvencii (i) vnútri oblasti degenerácie genetického kódu, alebo

(iii) aspoň jednou sekvenciou, ktorá hybridizuje so sekvenciou komplementárnou k sekvencii (i) alebo (ii), a poprípade

(iv) funkčne neutrálnymi mutáciami so zmyslom v (i).

3. Aminokyselinová sekvencia proteínu odvodená od nukleotidových sekvencií podľa nároku 1 alebo 2, znázornená v SEQ-ID-No. 3.

4. Koryneformné mikroorganizmy, najmä rodu *Corynebacterium*, transformované zavedením jednej alebo viacerých replikovateľných DNA podľa jedného z nárokov 1 alebo 2.

5. Kyvadlový vektor (shuttle vector) pZlaccDA, vyznačujúci sa restričnou mapou reprodukovanou na obr. 1, uložený v *Corynebacterium glutamicum* pod označením DSM 12785.

6. Spôsob výroby L-aminokyselín, najmä L-lyzínu, fermentáciou koryneformných baktérií, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa používajú baktérie, v ktorých sa zosilňuje, najmä nadmerne exprimuje gén accDA alebo nukleotidové sekvencie, ktoré ho kódujú.

7. Spôsob podľa nároku 5, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa používajú baktérie, v ktorých sa prídavne zosilňujú ďalšie gény biosyntetickej dráhy žiadanej L-aminokyseliny.

8. Spôsob podľa nároku 5, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa používajú baktérie, v ktorých sa aspoň čiastočne eliminujú metabolické dráhy, ktoré znižujú tvorbu žiadanej L-aminokyseliny.

9. Spôsob podľa nárokov 5 až 7, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa používa kmeň transformovaný plazmidovým vektorom a tento plazmidový vektor nesie nukleotidovú sekvenciu kódujúcu gén accDA.

10. Spôsob podľa nároku 8, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa používajú baktérie transformované plazmidovým vektorom pZlaccDA, uloženým v *Corynebacterium glutamicum* pod číslom DSM 12785.

11. Spôsob podľa jedného alebo viacerých z predchádzajúcich nárokov, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa používajú koryneformné baktérie, ktoré produkujú kyselinu L-asparágovú, L-asparagín, L-homoserín, L-treonín, L-izoleucín a L-metionín.

12. Spôsob podľa jedného alebo viacerých z nárokov 5 až 10, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa používajú koryneformné baktérie, ktoré produkujú L-lyzín.

13. Spôsob podľa jedného alebo viacerých z nárokov 5 až 11, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa prídavne ku génu accDA nadmerne exprimuje gén accBC.

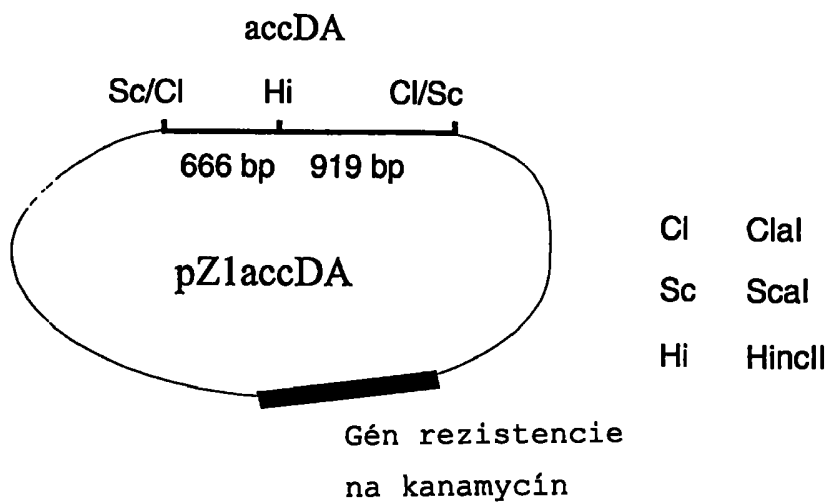
14. Spôsob podľa nároku 5, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa súčasne nadmerne exprimuje gén dapA kódujúci dihydrodipikolinátsyntázu.

15. Spôsob podľa nároku 5, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa súčasne amplifikuje fragment DNA sprostredkujúci rezistenciu voči S-(2-aminoetyl)cysteínu.

16. Spôsob fermentačnej výroby L-aminokyselín podľa jedného alebo viacerých z predchádzajúcich nárokov, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa uskutočňujú nasledovné kroky:

- a) fermentácia koryneformných baktérií produkujúcich žiadajú L-aminokyselinu, v ktorých sa zosilňuje aspoň gén accDA,
- b) koncentrovanie žiadanej L-aminokyseliny v médiu alebo v bunkách baktérií a
- c) izolácia žiadanej L-aminokyseliny.

Obr. 1:



Obr. 2:

