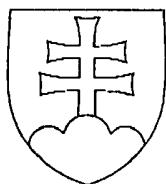


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA
VYNÁLEZU

(21) Číslo dokumentu:

537-96

(22) Dátum podania: 26.10.94

(13) Druh dokumentu: A3

(31) Číslo prioritnej prihlášky: 5-270828

(51) Int. Cl.⁶:

(32) Dátum priority: 28.10.93

C 12P 13/04

(33) Krajina priority: JP

(40) Dátum zverejnenia: 02.10.96

(86) Číslo PCT: PCT/JP94/01791, 26.10.94

(71) Prihlasovateľ: AJINOMOTO CO., Inc., Tokyo, JP;

(72) Pôvodca vynálezu: Kojima Hiroyuki, Kawasaki, JP;
Totsuka Kazuhiko, Kawasaki, JP,

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Spôsob produkcie cieľových látok použitím mikroorganizmov**

(57) Anotácia:

Spôsob zvyšovania produkcie cieľovej látky, ako je L-aminokyselina, antibiotikum, vitamín, rastový faktor a fyziologicky účinná látka, ktorá sa produkuje fermentáciou, s použitím mikroorganizmu, je založený na zlepšenej produkcií redukovaného nikotínamida-deníndinukleotidfosfátu, ktorá sa dosiahne zvýšením enzymovej aktivity nikotínamidnukleotidtranshydrogenázy v bunke uvedeného mikroorganizmu.

Spôsob produkcie cieľových látok použitím mikroorganizmov

Oblast techniky

Vynález sa týka spôsobu produkcie cieľovej látky s použitím mikroorganizmu. Typické príklady mikroorganizmu, použitého podľa tohto vynálezu, zahrnujú mikroorganizmy, patriace k rodu *Escherichia* a coryneform bacteria, ktoré sa bežne používajú na produkciu rôznych látok. Cieľové látky, ktoré sa takto produkujú, zahrnujú L-aminokyseliny, antibiotiká, vitamíny, rastové faktory, fyziologicky účinné látky, a iné látky, produkované mikroorganizmami. Táto prihláška opisuje spôsob, ktorý zlepšuje výtažnosť konečnej cieľovej látky v procese produkcie cieľovej látky s použitím mikroorganizmov.

Doterajší stav techniky

Fermentácia L-aminokyselin sa typicky považuje za dobre známy spôsob produkcie cieľovej látky s použitím mikroorganizmov. L-aminokyseliny sa nepoužívajú len do korenín a potravín, ale tiež ako zložky rôznych liečebných výživných zmesí, prísady do krmív pre zvieratá, činidlá vo farmaceutickom a chemickom priemysle, ďalej ako rastové faktory na produkciu L-aminokyselin, ako je L-lyzín a L-homoserín, s použitím mikroorganizmov. Coryneform bacteria, mikroorganizmy, patriace k rodom *Escherichia*, *Bacillus* a *Serratia*, a podobne, sú známe ako mikroorganizmy, ktoré možno použiť na fermentačnú produkciu L-aminokyselin.

Divoké typy baktérií (divoké typy kmeňov), auxotrofné kmene, indukované z divokých typov kmeňov, metabolické regulačné mutanty, indukované z divokých kmeňov ako rôzne, voči liečivám rezistentné mutanty, a kmene s vlastnosťami aj auxotrofných kmeňov, aj metabolických regulačných mutantov, možno použiť na fermentačnú produkciu L-aminokyselin. Látky, potrebné pre auxotrofné kmene, sa líšia od kmeňa ku kmeňu, a auxotrofné kmene, ktoré vyžadujú rovnakú látku, sa odlišo-

vali v stupni tejto auxotrófie. Podobne sa od seba odlišujú metabolické regulačné mutanty, získané ako rôzne, voči liečivám rezistentné mutanty.

V súčasnosti sa na fermentáciu L-aminokyselín používa technológia rekombinantnej DNA. Teória tejto technológie sa zakladá na zlepšení biosyntetického systému L-aminokyseliny v hostiteľskom mikroorganizme obohatením kódovania génom(ami) pre biosyntetický(é) enzým(y) L-aminokyseliny. Podrobnosti takejto technológie sú popísané napríklad v "Amino Acid Fermentation, Society Press Japan (1986)".

Avšak mikroorganizmy, ktoré sa bežne používajú pri fermentačnej produkcií L-aminokyselín, majú biosyntetické cesty, zahrnujúce biosyntetické cesty L-aminokyselín a biosyntetické cesty koenzýmov, ktoré sú identické s cestami prírodných typov mikroorganizmov. Mikroorganizmy, produkujúce L-aminokyseliny, boli množené desenzibilizáciou inhibície konečným produktom alebo podobne, ktorý existuje v biosyntetickej ceste L-aminokyseliny. Na účely dosiahnutia takého množenia sa napríklad použili dodanie auxotrofných vlastností alebo rezistencia voči liečivám bunke tohto mikroorganizmu, alebo zosilnenie kódovania génom(ami) pre biosyntetický(é) enzým(y) pomocou technológie rekombinantnej DNA.

Fermentáciou s použitím mikroorganizmov je možné produkováť mnoho látok iných, než sú L-aminokyseliny. Ako príklady takýchto látok uvádzame antibiotiká a vitamíny. Existujú rôzne druhy antibiotík a ako prekurzory biosyntéz takýchto antibiotík sa používajú rôzne materiály. Napríklad sa používajú cukry, aminokyseliny, kyselina octová, kyselina propiónová a kyselina mevalónová. Cieľové antibiotikum sa vytvára z takého prekurzora konverziou rôznych metabolítov, iných, než je prekurzor. Ten istý mechanizmus sa pozoruje u vitamínov a iných biogénnych látiek.

Pri produkcií vyššie uvedených látok s použitím mikroorganizmov sa každá látka vytvára v biosyntetickej ceste v bunke mikroorganizmu. Jedným z dôležitých koenzýmov, podstatných pre efektívnu činnosť zodpovedných enzýmov v biosyntetickom systéme, je redukovaný nikotínamidadenídinuk-

leotidfosfát (na ktorý budeme ďalej odkazovať ako na NADPH). Avšak vzťah medzi NADPH a produkciou látok s použitím mikroorganizmov neboli opísané.

Nikotínamiddinukleotidtranshydrogenáza (na ktorú budeme ďalej odkazovať jednoducho ako na "transhydrogenázu") je známa ako jeden z enzýmov, zodpovedných za produkciu NADPH. Je známe, že tento enzým je prítomný v rôznych mikroorganiznoch, vrátane tých, ktoré patria k rodu *Escherichia*. V *Escherichia coli*, typickom mikroorganizme, patriacom k rodu *Escherichia*, sa uskutočnilo čistenie transhydrogenázy (David M. Clarke a Philip D. Bragg, Eur. J. Biochem. 149, 517 až 523, 1985), klonovanie génu, ktorý ju kóduje (David M. Clarke a Philip D. Bragg, J. Bacteriology 162, 367 až 373, 1985), a stanovenie sekvencie nukleotidov uvedeného génu (David M. Clarke, Tip W. Loo, Shirley Gillam a Philip D. Bragg, Eur. J. Biochem. 158, 647 až 653, 1986), ako aj preukázanie existencie tohto enzýmu. Avšak fyziologická funkcia tohto enzýmu je stále takmer neznáma. To typicky ukazuje skutočnosť, že defektné varianty tohto enzýmu sa fenotypicky neprejavujú.

Podstata vynálezu

Cieľom tohto vynálezu je spôsob zlepšenia produktivity cieľovej látky s použitím mikroorganizmu, zahrnujúci kroky kultivácie mikroorganizmu v kultivačnom médiu, aby sa cieľová látka produkovala a zhromažďovala v kultivačnom médiu, a zachytávania cieľovej látky z kultivačného média.

Produktivita cieľovej látky sa vhodne zlepšila pomocou desenzibilizácie regulácie syntézy konečným(i) produkтом(ami) alebo podobne, ktoré sa produkujú biosyntetickou cestou cieľovej látky, a koenzýmu, potrebného na syntézu cieľovej látky, ktoré existujú v bunkách mikroorganizmov. Konkrétnym cieľom tohto vynálezu je poskytnúť prostriedky na zlepšenie produktivity cieľovej látky v súlade s úplne novou teóriou, ktorá je iná než vyššie uvedená.

Pri biosyntézach látok, ako sú L-aminokyseliny v živých

organizmoch, prebiehajú viaceré redukčné reakcie. V mnohých prípadoch sa koenzým NADPH fyziologicky používa ako intravitalna redukčná látka. Napríklad glutamátdehydrogenáza vyžaduje NADPH ako koenzým v biosyntetickej ceste kyseliny L-glutámovej. Aspartátsemialdehyddehydrogenáza, dihydroadipikolátreduktáza vyžadujú NADPH ako koenzým v biosyntetickej ceste L-lyzínu.

V iných biosyntetických cestách L-aminokyselin hrá NADPH dôležitú úlohu ako koenzým. Naviac, kyselina L-glutámová je dôležitá ako donor aminoskupín v mnohých biosyntetických cestách L-aminokyselin, preto je NADPH potrebné tiež na dodávanie aminoskupín pri biosyntézach L-aminokyselin.

NADPH sa najčastejšie pripravuje metabolizmom glukózy v pentózovom cykle, v ktorom sú zahrnuté glukóza-6-fosfátdehydrogenáza a fosfoglukonátdehydrogenáza. V pentózovom cykle možno vypočítať, že produkčná účinnosť NADPH je 12 molekúl vzhľadom na jednu molekulu glukózy, pretože sa uvoľňuje oxid uhličitý.

Na druhej strane je redukovaný nikotínamidadenindinukleotid (na ktorý budeme ďalej odkazovať ako na "NADH") molekulou, ktorá je veľmi podobná NADPH, avšak vo väčšine prípadov ju nemožno využiť ako koenzým pri biosyntéze L-aminokyseliny. NADH sa biosyntetizuje cez TCA cyklus a v bunke je obyčajne prítomné jeho dostatočné množstvo.

Čo sa týka biosyntetických ciest L-aminokyselin, intravitálne zložky, ktoré nemožno účinne využiť, často vznikajú procesom biosyntézy požadovaných L-aminokyselin z glukózy. Predpokladá sa, že takéto zložky sa normálne oxidujú cez TCA cyklus, čo vyúsťuje do tvorby veľkého množstva NADH.

Autori tohto vynálezu postavili hypotézu, že v priebehu produkcie cieľovej látky v procese tvorby cieľovej látky s použitím mikroorganizmu je potrebné veľké množstvo NADPH, glukóza sa nevyhnutne spotrebúva, aby vzniklo takéto NADPH, a v dôsledku toho sa produktivita cieľovej látky na spotrebovaný cukor znižuje (hypotéza 1).

Ďalej autorí tohto vynálezu postavili hypotézu, že int-

ravitálne zložky, ktoré nemožno účinne využiť v priebehu produkcie cieľovej látky, sa nevyhnutne akumulujú v procese tvorby cieľovej látky s použitím mikroorganizmu, a ktoré sa metabolizujú cez TCA cyklus, čo vyúsťuje do zvýšenia koncentrácie NADH v bunke (hypotéza 2).

Na základe vyššie opísaných hypotéz 1 a 2 sa predpokladá, že ak možno vnútrobunkové NADH účinne prekonvertovať na NADPH, cukor, ktorý je potrebný na biosyntézu NADPH mikroorganizmom, možno ušetriť a cieľovú látku možno produkovat s vyššou produktivitou. Súčasne sa predpokladá, že transhydrogenázu možno využiť ako prostriedok na konverziu NADH, vytvoreného cez TCA cyklus, na NADPH.

Autori tohto vynálezu vykonali štúdie na základe vyššie opísanej predstavy. Ako výsledok intenzívnych štúdií boli autori tohto vynálezu úspešní, keď získali DNA fragment, obsahujúci gén transhydrogenázy, z baktérie, patriacej k rodu *Escherichia*, a schopnosti mikroorganizmov produkovať redukovaný nikotínamidadeníndinukleotidfosfát sa zlepšili použitím tohto fragmentu. Autori tohto vynálezu ďalej zistili, že sa zlepšila produktivita cieľovej látky u vyššie uvedených mikroorganizmov, ktoré majú zlepšenú schopnosť produkovať redukovaný nikotínamidadeníndinukleotidfosfát.

Menovite má tento vynález nasledujúce znaky:

(1) spôsob produkcie cieľovej látky s použitím mikroorganizmu, ktorý zahrnuje kroky:

kultivácie mikroorganizmu v kultivačnom médiu, aby sa cieľová látka mohla vytvárať a kumulovať v kultivačnom médiu, a

zachytávanie cieľovej látky z kultivačného média, pričom je zlepšená produktivita mikroorganizmu, čo sa týka redukovaného nikotínamidadeníndinukleotidfosfátu;

(2) spôsob podľa (1), pričom cieľovou látkou je L-aminokyselina;

(3) spôsob podľa (2), pričom L-aminokyselina je vybraná zo skupiny, ktorá obsahuje L-treonín, L-lyzín, kyselinu L-glutámovú, L-leucín, L-izoleucín, L-valín a L-fenylalanín;

(4) spôsob podľa (1) alebo (2), pričom mikroorganizmom

je mikroorganizmus, patriaci k rodu *Escherichia*;

(5) spôsob podľa (1) alebo (2), pričom mikroorganizmom je coryneform bacterium;

(6) spôsob podľa ktoréhokoľvek z (1) až (5), pričom zlepšenie produktivity mikroorganizmu, čo sa týka redukovaného nikotínamidadeníndinukleotidfosfátu, sa dosiahne zvýšením enzýmovej aktivity nikotínamidnukleotidtranshydrogenázy v bunke mikroorganizmu;

(7) spôsob podľa (6), pričom zlepšenie produktivity mikroorganizmu, čo sa týka redukovaného nikotínamidadeníndinukleotidfosfátu, sa dosiahne zvýšením expresie kódovania génom pre nikotínamidnukleotidtranshydrogenázu v bunke mikroorganizmu; a

(8) spôsob podľa (7), pričom zlepšenie produktivity mikroorganizmu, čo sa týka redukovaného nikotínamidadeníndinukleotidfosfátu, sa dosiahne zvýšením počtu kópií génu, kódujúceho nikotínamidnukleotidtranshydrogenázu v bunke mikroorganizmu.

Cieľovou látkou, ktorá sa má produkovať mikroorganizmom podľa tohto vynálezu, sú rôzne L-aminokyseliny, ako L-treonín, L-lyzin, kyselina L-glutámová, L-leucín, L-izoleucín, L-valín a L-fenylalanín. To sa môže vzťahovať na ktorúkoľvek inú okrem vyššie uvedených, pokiaľ je na jej biosyntézu potrebný NADPH, z tých, ktoré sa doteraz produkovali mikroorganizmami, ako nukleové kyseliny, ako je kyselina guanylová a kyselina inozínová, vitamíny, antibiotiká, rastové faktory a fyziologicky účinné látky. Nie je ďalej potrebné uvádzat, že dokonca aj v prípade látky, ktorá sa doteraz neprodukovala s použitím mikroorganizmu, možno tento vynález aplikovať za predpokladu, že na jej biosyntézu je potrebný NADPH.

Pri biosyntéze streptomycínu sa napríklad NADPH používa na syntézu dTDP-4-oxo-4,6-dideoxy-D-glukózy z dTDP-glukózy. Naviac, aminokyseliny slúžia ako prekurzory v prípade peptidových antibiotík, a teda NADPH sa samozrejme vyžaduje na ich biosyntézu už z princípu. Ďalej, prekurzormi penicilínu, beta-laktámového antibiotika, sú L-valín, L-cystein a kyse-

lina L-alfa-aminoacidová, a teda NADPH je potrebný na ich biosyntézu.

Ak chceme vedieť, ktorá látka vyžaduje NADPH pri jej biosyntéze, táto skutočnosť sa môže ozrejmiť z biosyntetickej cesty, ak jej biosyntetická cesta už bola zistená.

Mikroorganizmus, ktorý sa má použiť podľa tohto vynálezu, nie je zvlášť ohraničený za predpokladu, že patrí k tým, ktoré sa doteraz používali na produkciu látok, ako sú baktérie, patriace k rodu *Escherichia*, coryneform bacteria, baktérie, patriace k rodu *Bacillus*, a baktérie, ktoré patria k rodu *Serratia*. Výhodným je taký mikroorganizmus, v ktorom sa pre tento mikroorganizmus získal DNA fragment, obsahujúci replikačný začiatok plazmidu, a možno zvýsiť funkcie génu transhydrogenázy a počet kópií génu transhydrogenázy. Na druhej strane kmeň, ktorý mal pôvodne vysokú schopnosť produkovať cieľovú látku, je najvýhodnejší ako kmeň, ktorý sa použije na zlepšenie produktivity podľa tohto vynálezu. Dôvodom je, že sa predpokladá, že u kmeňa s vysokou produktivitou bude účinok zlepšenia produktivity podľa tohto vynálezu pôsobiť silne, pretože javy podľa vyššie opísanej hypotézy 1 a 2 účinkujú silne. Uvádzame kmeň *Escherichia coli* B-3996 a podobne, keď cieľovou látkou je L-treonín, kmeň *Escherichia coli* AJ12604 (FERM BP-3579) a podobne, keď cieľovou látkou je L-fenylalanín, kmeň *Escherichia coli* AJ12624 (FERM BP-3853) a podobne, keď cieľovou látkou je kysselina L-glutámová, a *Brevibacterium lactofermentum* AJ3990 (FERM P-3387, ATCC 31269) a podobne, keď cieľovou látkou je L-lyzín.

Žiadny problém nie je s médiom, ktoré sa má použiť na produkciu cieľovej látky, ak sa použije dobre známe médium z tých, ktoré sa dosiaľ používali, v závislosti od použitého mikroorganizmu. Menovite je k dispozícii bežné médium, ktoré obsahuje zdroj uhlika, zdroj dusíka, anorganické ióny a voliteľne ďalšie organické zložky. Na uskutočnenie tohto vynálezu sa nevyžaduje žiadne špeciálne médium.

Ako zdroj uhlika možno použiť cukry, ako sú glukóza, laktóza, galaktóza, fruktóza a škrobový hydrolyzát; alkoho-

ly, ako sú glycerol a sorbitol; a organické kyseliny, ako sú kyselina fumarová, kyselina citrónová a kyselina jantárová a podobne.

Ako zdroj dusíka možno použiť anorganické amónne soli, ako sú síran amónny, chlorid amónny a fosforečnan amónny; organický dusík, ako je sójový hydrolyzát; plynný amoniak; a vodný roztok amoniaku.

Čo sa týka organických stopových nutričných zdrojov, potrebné látky, ako je vitamín B1, L-homoserín a L-tyrozín, alebo extrakt z kvasníc, sa vyžadujú v primeraných množstvách. Okrem vyššie uvedených sa voliteľne pridávajú malé množstvá fosforečnanu draselného, síranu horečnatého, iónu železa, iónu mangánu a podobne.

Kultiváciu možno uskutočniť za dobre známych podmienok, ktoré sa doteraz používali, čo závisí od použitého mikroorganizmu. Menovite je výhodné uskutočniť kultiváciu po dobu 16 až 120 hodín za aeróbnych podmienok. Kultivačná teplota sa udržuje medzi 25 °C a 45 °C a pH sa počas kultivácie udržuje medzi 5 až 8. Mimochodom, na nastavenie pH možno použiť anorganické alebo organické kyslé alebo zásadité látky, ako aj plynný amoniak a podobne.

Podľa tohto vynálezu sa nevyžaduje žiadny zvláštny spôsob zachytávania metabolického produktu z kvapaliny média po skončení kultivácie. Menovite možno tento vynález uskutočniť kombináciou dobre známych spôsobov, ako je metóda iónomeničovej živice, precipitačná metóda a podobne.

Ako príklad prostriedkov na zvýšenie NADPH produktivity mikroorganizmu uvádzame prostriedky na zvýšenie enzýmovej aktivity transhydrogenázy v mikrobiálnych bunkách.

Ako príklad prostriedkov na zvýšenie enzýmovej aktivity transhydrogenázy uvádzame prostriedky na zvýšenie expresie génu transhydrogenázy v mikrobiálnych bunkách. Ďalej, iným prostriedkom na zvýšenie enzýmovej aktivity transhydrogenázy je modifikácia génu transhydrogenázy a vytvorenie transhydrogenázy so zvýšenou aktivitou.

Ako príklad prostriedku na zvýšenie expresie génu transhydrogenázy v mikrobiálnych bunkách uvádzame prostrie-

dok na zvýšenie počtu kópií génu transhydrogenázy v mikrobiálnych bunkách.

Na to, aby sa zvýšil počet kópií génu transhydrogenázy, je nevyhnutný fragment DNA, ktorý obsahuje vyššie uvedený gén. Mimochodom, gén transhydrogenázy bol klonovaný v kmeni *Escherichia coli* K-12 ako baktéria, patriacej k rodu *Escherichia*, a jeho sekvencia nukleotidov bola stanovená (D.M. Clarke a spol., Eur. J. Biochem. 158, 647 až 65, 1986). Teda príprava DNA fragmentu, obsahujúceho vyššie uvedený gén, sa dosiahne použitím spôsobu, ktorý opísali D.M. Clarke a spol. Ďalej možno požadovaný DNA fragment získať hybridizačnou metódou s použitím syntetickej DNA vzorky, pripravenej podľa sekvencie nukleotidov, ktorú opísali D.M. Clarke a spol., a PCR metódou s použitím syntetických DNA primérov, pripravených podľa vyššie uvedenej sekvencie nukleotidov. Ak sa DNA fragment, obsahujúci gén transhydrogenázy, naviaže na vektor DNA, autonómne replikovateľný v cieľovom mikroorganizme, a vloží sa do vyššie uvedeného mikroorganizmu, je možné zvýšiť počet kópií génu transhydrogenázy.

Primér DNA, ktorý sa používa pri klonovaní génu transhydrogenázy z baktérie, patriacej k rodu *Escherichia*, s použitím PCR metódy, možno vhodne pripraviť na základe napríklad sekvencie, znácej v *Escherichia coli* (D.M. Clarke a spol., Eur. J. Biochem. 158, 647 až 653, 1986). Pretože transhydrogenáza obsahuje dve podjednotky, môže byť nevhodné zosilniť oba gény pntA a pntB každej z nich. Dva priméry 5'-CTGATTTTGGATCCAGATCACAG-3' (SEQ ID NO:1) a 5'-CGTTCTGTTAACGCTTCATAAA-3' (SEQ ID NO:2), ktoré môžu zosilniť oblasť 3 kb, obsahujúcu oba gény pntA a pntB, sú vhodné. Tieto priméry sa mierne odlišujú od sekvencie, ktorú opísali D.M. Clarke a spol. Avšak v dôsledku zmeny v sekvenции je možné zaviesť miesto BamHI štiepenia v protiprúdovom smere od oboch génov pntA a pntB, a miesto HindIII štiepenia v poprúdovom smere od oboch génov pntA a pntB. Ani miesto BamHI, ani miesto HindIII neexistujú v žiadnom z oboch génov, ani v ich susedstve. Preto sú vhodné pri klonovaní zosilneného DNA fragmentu s použitím týchto reštrikčných enzý-

mov a pri prenose do iného vektora DNA. Syntézu priméru DNA možno uskutočniť podľa bežnej metódy s použitím DNA syntetizéra, model 380B, ktorý vyrába firma Applied Biosystems, a s použitím fosfoamiditovej metódy (pozri Tetrahedron Letters 22, 1859, 1981). PCR možno uskutočniť s použitím zariadenia Thermal Cycler Model PJ2000, ktoré vyrába firma Takara Shuzo Co., Ltd., a s použitím Tag DNA polymerázy spôsobom, ktorý navrhuje výrobca.

DNA fragment, obsahujúci gén transhydrogenázy, možno získať z mikroorganizmov iných než z baktérií, ktoré patria k rodu *Escherichia*. Požadovaný DNA fragment možno získať s použitím hybridizačnej metódy so syntetickou DNA vzorkou, pripravenou podľa sekvencie nukleotidov, opísanej D.M. Clarkeom a spol., alebo s použitím PCR metódy so syntetickými primérmi DNA, pripravenými podľa vyššie uvedenej sekvencie nukleotidov, ako metódy na jeho získanie.

DNA vzorku, ktorá sa má použiť pri hybridizačnej metóde, alebo priméry DNA, ktoré sa majú použiť pri klonovaní génu s použitím PCR metódy, možno vhodne pripraviť na základe napríklad sekvencie, známej v *Escherichia coli* (D.M. Clarke a spol., Eur. J. Biochem. 158, 647 až 653, 1986). Predpokladá sa, že sekvencia nukleotidov génu je rôzna pre každý z mikroorganizmov. Je teda žiaduce pripraviť syntetické DNA, súhlasné s časťami, zachovanými vzhľadom na transhydrogenázy, pochádzajúce z týchto mikroorganizmov.

Gén transhydrogenázy, zosilnený PCR metódou, sa naviaže na vektor DNA, autonómne replikovateľný v bunke baktérie, patriacej k rodu *Escherichia*, keď sa zavedie do baktérie, patriacej k rodu *Escherichia*, a zavedie sa do buniek baktérie, patriacej k rodu *Escherichia*.

V prípade zavedenia získaného DNA fragmentu, obsahujúceho gén transhydrogenázy, do mikroorganizmu iného, než je baktéria, patriaca k rodu *Escherichia*, vyššie uvedený DNA fragment sa naviaže na vektor DNA, autonómne replikovateľný v bunke mikroorganizmu, do ktorého sa zaviedol vyššie uvedený DNA fragment, a zavedie sa do vyššie uvedených buniek.

Ako vektor DNA, ktorý sa dá použiť podľa tohto vynále-

zu, je výhodný plazmidový vektor DNA, pre ktorý ako príklady uvádzame pUC19, pUC18, pBR322, pHSG299, pHSG399, RSF1010 a podobne. Okrem uvedených sú tiež k dispozícii fágové DNA vektory. Aby sa účinne dosiahla expresia génu transhydrogenázy, je tiež prijateľné použitie promótora, zabudovateľného do mikroorganizmov, ako je lac, trp a PL. Naviac, aby sa zvýšil počet kópií génu transhydrogenázy, DNA, obsahujúcu vyššie uvedený gén, možno včleniť do chromozómu pomocou metódy, používajúcej transpozón (Berg, D.E. a Berg, C.M., Bio/Technol. 1, 417, 1983), Mu fág (japonský zverejnený patent č. 2-109985), alebo homologickú rekombináciu (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. (1972)).

Ak je mikroorganizmom, do ktorého sa zaviedol uvedený gén, coryneform bacteria, vektorom DNA, ktorý možno použiť podľa tohto vynálezu, je plazmidový vektor, autonómne replikovateľný v coryneform bacteria, ako je pAM330 (pozri japonský patentový spis č. 1-11280) a pHM1519 (pozri japonský zverejnený patent č. 58-77895).

Aby sa vybral kmeň, ktorý má skutočne zlepšenú enzymovú aktivitu transhydrogenázy, spomedzi kandidátov, ktorí majú potenciálne zlepšenú enzymovú aktivitu transhydrogenázy, možno použiť napríklad známu metódu (David M. Clarke a Philip D. Bragg, Journal of Bacteriology 162, 367 až 373, 1985) ako metódu na potvrdenie zlepšenia enzymovej aktivity transhydrogenázy.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obr.1 znázorňuje prípravu plazmidu pMV::THY.

Obr.2 znázorňuje prípravu plazmidu pHSG::THYB.

Obr.3 znázorňuje prípravu plazmidu pSU::THY.

Tento vynález konkrétnejšie vysvetlime ďalej s odkazom na príklady.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Priklad 1

Klonovanie génu transhydrogenázy

Sekvencie nukleotidov génov pntA a pntB, ktoré kódujú transhydrogenázu *Escherichia coli*, boli stanovené predtým (D.M. Clarke a spol., Eur. J. Biochem. 158, 647 až 653, 1986) a uvádza sa, že pntA a pntB kódujú proteíny s 502 zvyškami aminokyselín a so 462 zvyškami aminokyselín. Naviac tiež bolo známe, že oba vyššie uvedené proteíny sú potrebné na prejavenie enzymovej aktivity transhydrogenázy, že oba gény pntA a pntB sú umiestnené sériovo na chromozómovej DNA a že oba gény možno takto klonovať v jednom DNA fragmente.

Na uľahčenie následných operácií autori tohto vynálezu súčasne klonovali nielen oba gény pntA a pntB, ale oblasť, existujúcu v protiprúdovom smere od týchto génov, ktorá má promotorovú aktivitu. Konkrétnie, DNA fragment, obsahujúci gény a promotorovú oblasť, sa zosilnil PCR, aby sa klonovala.

Dva syntetické oligonukleotidy so sekvenciou 5'-CTGATT-TTTGGATCCAGATCACAG-3' (SEQ ID NO:1) a 5'-CGTTCTGTTAACGCTTCT-CAATAA-3' (SEQ ID NO:2) sa syntetizovali ako priméry pre PCR bežným spôsobom. Ako DNA templát pre PCR sa pripravil celý genóm DNA *Escherichia coli* K-12 MC1061 metódou autorov Saitoh a Miura (Biochem. Biophys. Acta 72, 619, 1963). Cielový DNA fragment sa zosilnil PCR s použitím dvoch oligonukleotidových primérov a templátovej chromozómovej DNA metódou podľa Erlicha a spol. (PCR Technology, Stockton Press 1989). Syntetické DNA, používané ako priméry, majú sekvencie nukleotidov s malými rozdielmi v zodpovedajúcich centrálnych častiach fragmentov syntetických DNA oproti sekvencii nukleotidov, ktorú popísali D.M. Clarke a spol. Tá je navrhnutá na zavedenie miesta BamHI štiepenia a miesta HindIII štiepenia pri tvorbe syntetických oligonukleotidov. Tieto štiepne miesta reštrikčných enzymov sú potrebné na vloženie zosilne-

ného DNA fragmentu do vektora DNA. Zavedenie reštrikčných miest spôsobuje nesúlad medzi primérmi a chromozómovou DNA v procese PCR. Avšak tento nesúlad neovplyvní zosilnenie DNA pomocou PCR, pretože tieto reštrikčné miesta boli umiestnené v centrálnych častiach syntetického DNA fragmentu. Zosilnenie DNA fragmentu veľkosti 3,0 kb sa potvrdilo elektroforézou v agarózovom géli.

Zosilnený DNA fragment veľkosti 3,0 kb a plazmidový vektor pMW118 s markerom rezistentným na ampicilín (dostupný od firmy Nippon Gene Inc.) boli natrávené BamHI a HindIII. Oba natrávené DNA fragment a vektor DNA sa naviazali, aby sa pripravila rekombinantná DNA s DNA ligázou. Výsledný rekombinantný plazmid sa pomenoval pMW::THY (pozri obr.1).

Escherichia coli JM109 (dostupná od firmy Takara Shuzo Co., Ltd.) sa transformovala plazmidom pMW::THY a získala sa transformovaná *Escherichia coli* JM109 (pMW::THY). Enzýmová aktivita transhydrogenázy, existujúcej v každom roztoku bunkového extraktu z *Escherichia coli* JM109 a *Escherichia coli* JM109 (pMW::THY), sa merala známym spôsobom (David M. Clarke a Philip D. Bragg, J. Bacteriology 162, 367 až 373, 1985). Výsledok je uvedený v tabuľke 1.

Tabuľka 1

Kmene	JM109	JM109 (pMW::THY)
Špecifická aktivita transhydrogenázy (u/mg proteínu)	1,0	1,7

Ako je uvedené v tabuľke 1, je zrejmé, že *Escherichia coli* JM109 (pMW::THY) má vyššiu enzýmovú aktivitu transhydrogenázy než *Escherichia coli* JM109. Výsledkom sa dokázalo, že DNA fragment, vložený do plazmidu pMW::THY, obsahuje gén transhydrogenázy. *Escherichia coli*, obsahujúca plazmid pMW::THY, bola označená ako kmeň AJ12929. Kmeň AJ12929 bol

uložený v National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, the Ministry of International Trade and Industry (Národný inštitút biologických vied a humánnej technológie, Agentúra priemyselných vied a technológie, Ministerstvo medzinárodného obchodu a priemyslu) (1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan; zip code 305) dňa 4. októbra 1993 pod číslom uloženia FERM P-13890, prenesený z pôvodného miesta uloženia do medzinárodného depozitu na základe Budapeštianskej dohody zo 4. septembra 1994 a bol uložený pod číslom uloženia FERM BP-4798.

Plazmid DNA pMW::THY sa pripravil bežným spôsobom a natrávil BamHI a HindIII, aby sa izoloval 3,0 kb DNA fragment, obsahujúci gén transhydrogenázy. Plazmidový vektor pHSG399 s markerom rezistentným na chloramfenikol (dostupný od firmy Takara Shuzo Co., Ltd.) sa štiepil pomocou BamHI a HindIII a tento veľký fragment sa izoloval. Potom sa DNA fragment, obsahujúci gén transhydrogenázy, a BamHI-HindIII veľký fragment pHSG399 sa naviazali na DNA ligázu, aby sa získal plazmid pHSG::THY.

Plazmid pHSG::THY sa môže autonómne replikovať v bunkách mikroorganizmov, patriacich k rodu *Escherichia*, ale neudrží sa stabilne v bunkách coryneform bacteria. Preto bol replikačný začiatok, získaný z autonómne replikovateľného plazmidu, získaného z coryneform bacteria, zavedený do plazmidu pHSG::THY.

Plazmid pHM1519, autonómne replikovateľný v bunkách coryneform bacteria (pozri japonský zverejnený patent č. 58-77895), sa štiepil reštrikčným enzýmom BamHI, aby sa získal DNA fragment s 3,0 kb, obsahujúci replikačný začiatok. Na druhej strane sa plazmid pHSG::THY štiepil BamHI, aby sa získal DNA fragment. Oba DNA fragmenty sa naviazali na DNA ligázu, aby sa pripravil plazmid pHSG::THYB (obr.2). Kmeň *Escherichia coli*, obsahujúci pHSG::THYB, sa označil ako kmeň AJ12872. Tento kmeň AJ12872 bol uložený v National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial

Science and Technology, the Ministry of International Trade and Industry dňa 4. októbra 1993 pod číslom uloženia FERM P-13889, prenesený z pôvodného miesta uloženia do medzinárodného depozitu na základe Budapeštianskej dohody zo 14. septembra 1994 a bol uložený pod číslom uloženia FERM BP-4797.

Ďalej sa plazmid pSU18, ktorý je autonómne replikovateľný v bunkách baktérie, patriacej k rodu *Escherichia*, a má kanamycinový rezistentný marker (borja, Bartlome a spol., Gene 102, 75 až 78, 1991) štiepil reštrikčnými enzýmami BamHI a HindIII, aby sa získal veľký fragment. Tento veľký fragment sa naviazal na vyššie popísaný DNA fragment s 3,0 kb, obsahujúci gén transhydrogenázy, s použitím DNA ligázy, aby sa pripravil plazmid pSU::THY (obr.3). Kmeň *Escherichia coli*, obsahujúci pSU::THY, sa označil ako kmeň AJ12930. Ten-to kmeň AJ12930 bol uložený v National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, the Ministry of International Trade and Industry dňa 4. októbra 1993 pod číslom uloženia FERM P-13891, prenesený z pôvodného miesta uloženia do medzinárodného depozitu na základe Budapeštianskej dohody zo 4. septembra 1994 a bol uložený pod číslom uloženia FERM BP-4799.

Potvrdilo sa, ako sa ovplyvnila produktivita rôznych L-aminokyselín v bunkách baktérie, patriacej k rodu *Escherichia*, alebo coryneform bacteria, zvýšením aktivity transhydrogenázy v oboch baktériách.

Príklad 2

Fermentačná produkcia L-treonínu kmeňom so zavedenou transhydrogenázou

Ako L-treonín produkujúca baktéria *Escherichia coli* má spomedzi v súčasnosti známych kmeňov najvyššiu produkčnú schopnosť kmeň B-3996 (pozri japonský zverejnený patent č. 3-501682 (PCT)). Preto sa kmeň B-3996 použil ako hostiteľ na

vyhodnotenie účinku zlepšenia transhydrogenázy. Kmeň B-3996 obsahuje plazmid pVIC40 (medzinárodný patentový spis WO90/04636), ktorý sa získal vložením treonínového operónu do plazmidu pAYC32 vektoru so širokým hostiteľským rozsahom, ktorý má marker, rezistentný na streptomycin (porovnaj Chistoserdov A.Y. a Tsygankov Y.D., Plasmid 16, 161 až 167, 1986). Kmeň B-3996 bol uložený v Research Institute for Genetics and Industrial Microorganism Breeding (Výskumný ústav pre genetiku a priemyselné množenie mikroorganizmov) pod registračným číslom RIA1867.

Plazmid pMW::THY sa späť získal z *Escherichia coli* AJ12929, získaného v príklade 1, pomocou metódy autorov Maniatis a spol. (Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., Molecular cloning (Molekulárne klonovanie), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1, 21, 1989). Získaný plazmid pMW::THY sa zaviedol do kmeňa B-3996 pomocou metódy D.M. Morrisona (Methods in Enzymology 68, 326, 1979). Kmeň B-3996, transformovaný pMH::THY, sa označil ako kmeň B-3996(pMW::THY). Kmeň B-3996 a kmeň B-3996(pMW::THY) sa kultivovali pri nasledujúcich podmienkach.

Kultivácia sa uskutočňovala 38 hodín pri teplote 37 °C za miešania so 114 až 116 otáčok/min s použitím média so zložením, uvedeným v tabuľke 2. V tabuľke 2 sa zložky A, B a C oddelene pripravili, sterilizovali a chladili a zmiešali sa s použitím 16/20 objemu zložky A, 4/20 objemu zložky B a 30 g/l zložky C. Výsledky kultivácie sú uvedené v tabuľke 3. Zistilo sa, že produktivita L-treonínu sa zlepšila zvýšením aktivity vnútrobunkovej transhydrogenázy v L-treonín produkujúcej baktérii, ktorá patrí k rodu *Escherichia*.

Tabuľka 2. Médium pre treonín produkujúce médium

(A) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	(g/l) 16
KH_2PO_4	1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,01
Kvasnicový extrakt (Difco)	2
L-Met	0,5
Nastavené na pH 7,0 pomocou KOH a autoklávované pri 115 °C 10 minút	(16/20 objemu)
(B) 20%-ná glukóza	
Autoklávovaná pri 115 °C 10 minút	(4/20 objemu)
(C) CaCO_3 podľa liekopisu	
Autoklávovaný pri 180 °C 2 dni	(30 g/l)
Antibiotiká (streptomycin: 100 µg/ml, kanamycin: 5 µg/ml)	

Tabuľka 3

Kmene	B-3996	B-3996(pMV::THY)
Treonín (g/l)	12,97	13,99

Príklad 3

Fermentačná produkcia L-lyzínu kmeňom so zavedenou transhydrogenázou

Zistovalo sa, či sa L-lyzínová produktivita zlepšila zvýšením aktivity vnútrobunkovej transhydrogenázy v coryne-

form bacteria, ktorá produkuje L-lyzín, alebo nie. Ako L-lyzín produkujúca baktéria, patriaca ku coryneform bacteria, sa použil kmeň *Brevibacterium lactofermentum* AJ3990. Kmeň AJ3990 bol uložený v National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, the Ministry of International Trade and Industry a dostal číslo uloženia FERM P-3387. Plazmid pHSG::THYB sa späť získal z kmeňa *Escherichia coli* AJ12872, získaného v príklade 1, pomocou metódy autorov Maniatis a spol. (Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1, 21, 1989). Získaný plazmid sa zaviedol do kmeňa AJ3990 pomocou transformačnej metódy s použitím elektrického impulzu (pozri japonský verejnený patent č. 2-207791). Kmeň AJ3990, transformovaný pHSG::THYB, sa označil ako kmeň AJ3990(pHSG::THYB). Kmeň AJ3990 a kmeň AJ3990(pHSG::THYB) sa kultivovali pri nasledujúcich podmienkach.

Kultivácia sa uskutočňovala 72 hodín pri teplote 31,5 °C za miešania so 114 až 116 otáčkami/min s použitím média so zložením, uvedeným v tabuľke 4. Ako cukry sa použili tri rôzne cukry, glukóza, sacharóza a fruktóza. Výsledky kultivácie sú uvedené v tabuľke 5. Zistilo sa, že produktivita L-lyzínu sa zlepšila zvýšením aktivity vnútrobunkovej transhydrogenázy v L-lyzín produkujúcej coryneform bacteria.

Tabuľka 4. Médium na produkciu lyzínu

Cukor	36	g/l
NH ₄ Cl	20	g/l
KH ₂ PO ₄	1	g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,4	g/l
FeSO ₄ · 7H ₂ O	10	mg
MnSO ₄ · 5H ₂ O	8	mg
Hydrolyzát sójového proteínu (ako dusík)	1	mg
Tiamín-HCl	100	mg
Biotín	300	mg

Po autoklávovaní pri 115 °C 10 minút sa pridali 3 % oddelene sterilizovaného uhličitanu vápenatého.

Tabuľka 5

	Akumulácia lyzínhydrochloridu množstvo (g/l)	
	AJ 3990	AJ 3990 (pHSG: : THYB)
Glukóza	13,6	14,5
Sacharóza	11,1	12,6
Fruktóza	8,2	11,9

Príklad 4

Fermentačná produkcia L-fenylalanínu kmeňom so zavedenou transhydrogenázou

Zistovalo sa sa, či sa L-fenylanínová produktivita zlepšila zvýšením aktivity vnútrobunkovej transhydrogenázy v L-fenylalanín produkujúcej baktérii, patriacej k rodu *Escherichia*, alebo nie. Ako L-fenylalanín produkujúca baktéria, patriaca k rodu *Escherichia*, sa použil kmeň *Escherichia coli* AJ12604. Kmeň AJ12604 obsahuje plazmid pBR-aroG4, ktorý sa získal vložením mutantu aroG génu do vektorového plazmidu pBR322, ktorý má marker, rezistentný na ampicilin, a do plazmidu pACMAB, ktorý sa získal vložením mutantu pheA génu do vektorového plazmidu pACYC184, ktorý má marker, rezistentný na chloramfenicol (pozri japonský zverejnený patent č. 5-236947). Kmeň AJ12604 bol uložený v National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, the Ministry of International Trade and Industry dňa 28. januára 1991 pod číslom uloženia FERM P-11975, prenesený z pôvodného miesta uloženia do medzinárodného depozitu na základe Budapeštianskej dohody z 26. septembra 1991 a bol uložený pod číslom uloženia FERM BP-3579. Plazmid pSU::THY sa späť získal z kmeňa *Escherichia coli* AJ12930, získaného v príklade 1, pomocou metódy autorov Maniatis a spol. (Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1, 21, 1989). Získaný plazmid sa zaviedol do kmeňa AJ12604 pomocou metódy D.M. Morrisona (Methods in Enzymology 68, 326, 1979). Kmeň AJ12604, transformovaný pSU::THY, sa označil ako kmeň AJ12604(pSU::THY). Kmeň AJ12604 a kmeň AJ12604(pSU::THY) sa kultivovali pri nasledujúcich podmienkach.

Kultivácia sa uskutočňovala 16 hodín pri teplote 37 °C za miešania so 114 až 116 otáčkami/min s použitím média so zložením, uvedeným v tabuľke 6. Výsledky kultivácie sú uvedené v tabuľke 7. Zistilo sa, že produktivita L-fenylalanínu sa zlepšila zvýšením aktivity vnútrobunkovej transhydrogenázy v L-fenylalanín produkujúcej baktérii, ktorá patrí k rodu *Escherichia*.

Tabuľka 6. Médium na produkciu fenylalanínu

	(g/l)
Glukóza	20
Na ₂ HPO ₄	29,4
KH ₂ PO ₄	6
NaCl	1
NH ₄ Cl	2
Citrát sodný	20
L-glutamát sodný	0,4
MgSO ₄ · 7H ₂ O	3
CaCl ₂	0,23
Tiamín-HCl	2 mg
L-tyrozín	75 mg

Po autoklávovaní pri 115 °C 10 minút sa pridali 3 % oddeľene sterilizovaného uhličitanu vápenatého.

Tabuľka 7

Kmeň	AJ12604	AJ12604 (pSU: : THY)
L-fenylalanín	4,28	4,89
Akumulované množstvo (g/l)	3,75	4,28

Zoznam sekvencií

(1) Všeobecná informácia:

- (i) Prihlásovateľ: Ajimoto Co. Inc.
- (ii) Názov vynálezu: Spôsob produkcie látok

- (iii) Počet sekvencií: 2
 - (iv) Adresa pre korešpondenciu:
 - (A) Adresát:
 - (B) Ulica:
 - (C) Mesto:
 - (D) Štát:
 - (E) Krajina:
 - (F) Smerové číslo:
 - (vi) Údaje o tejto prihláške:
 - (A) Číslo prihlášky:
 - (B) Dátum podania:
 - (C) Zatriedenie
 - (vii) Údaje o predchádzajúcej prihláške:
 - (A) Číslo prihlášky:
 - (B) Dátum podania:
 - (viii) Informácia o zástupcovi/agentovi:
 - (A) Meno:
 - (B) Registračné číslo:
 - (C) Odkazové/registračné číslo:
 - (ix) Telekomunikačná informácia:
 - (A) Telefón:
 - (B) Telefax:
- (2) Informácia o SEQ ID NO:1:
- (i) Charakteristiky sekvencie:
 - (A) Dĺžka: 24
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topológia: lineárne
 - (ii) Molekulový typ: iný...synetická DNA
 - (iii) Hypotetický: nie
 - (xi) Popis sekvencie: SEQ ID NO:1:
CTGATTTTG GATCCAGATC ACAG

- (2) Informácia o SEQ ID NO:2:
- (i) Charakteristiky sekvencie:
 - (A) Dĺžka: 24

- (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topológia: lineárne
- (ii) Molekulový typ: iný...syntetická DNA
 - (iii) Hypotetický: nie
 - (xi) Popis sekvencie: SEQ ID NO:2:
CGTTCTGTTA AGCTTCTCA ATAA

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Spôsob produkcie cieľovej látky s použitím mikroorganizmu, vyznačujúci sa tým, že zahrnuje kroky:

kultivácie mikroorganizmu v kultivačnom médiu, aby sa cieľová látka mohla vytvárať a akumulovať v uvedenom kultivačnom médiu, a

zachytávania cieľovej látky z uvedeného kultivačného média,

pričom je zvýšená produktivita mikroorganizmu, čo sa týka redukovaného nikotínamidadenídinukleotidfosfátu.

2. Spôsob podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že uvedenou cieľovou látkou je L-aminokyselina.

3. Spôsob podľa nároku 2, vyznačujúci sa tým, že uvedená L-aminokyselina je vybraná zo skupiny, ktorá obsahuje L-treonín, L-lyzín, kyselinu L-glutámovú, L-leucín, L-izoleucín, L-valín a L-fenylalanín.

4. Spôsob podľa nároku 1 alebo 2, vyznačujúci sa tým, že uvedeným mikroorganizmom je mikroorganizmus, patriaci k rodu *Escherichia*.

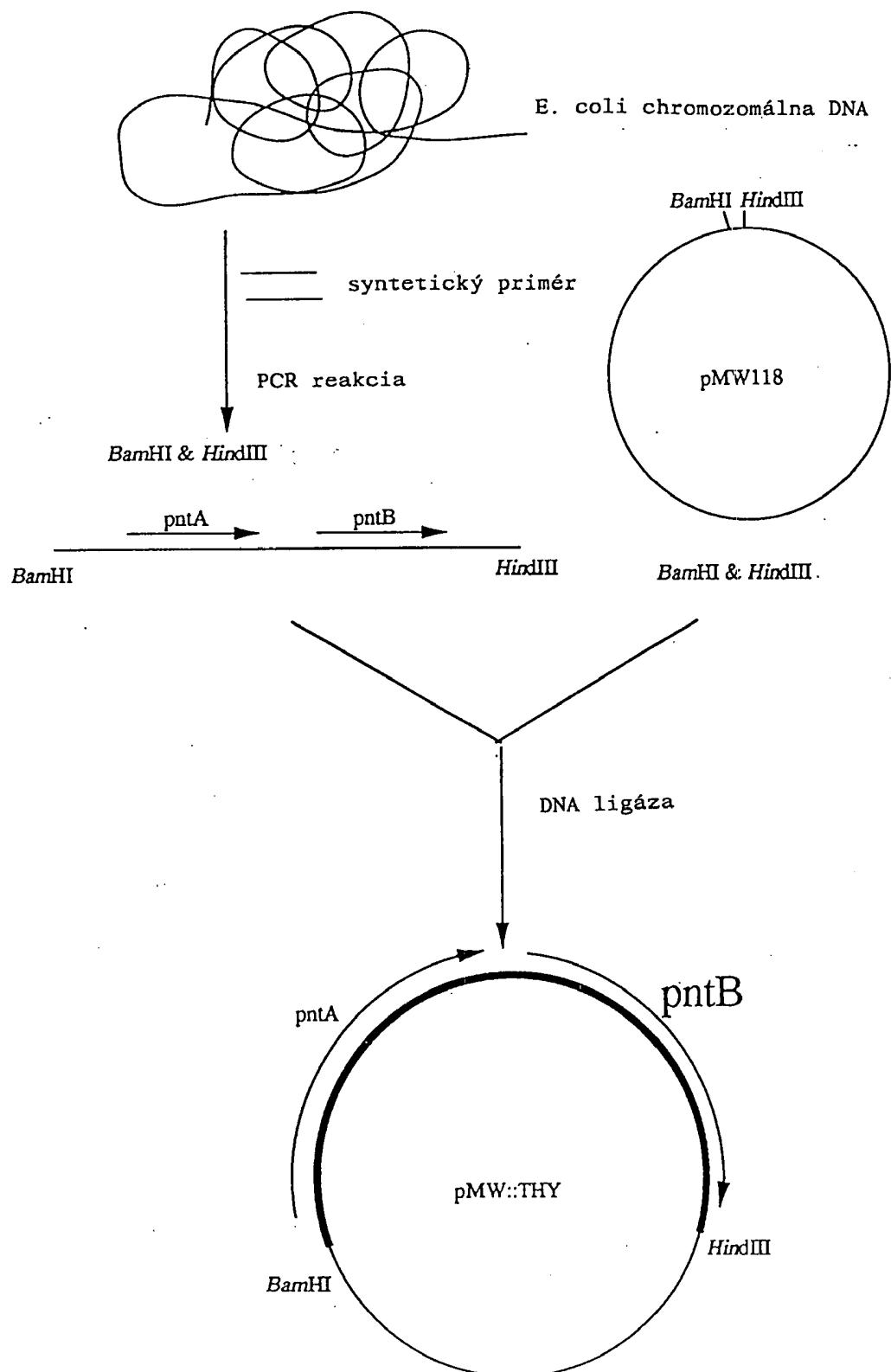
5. Spôsob podľa nároku 1 alebo 2, vyznačujúci sa tým, že uvedeným mikroorganizmom je coryneform bacterium.

6. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 5, vyznačujúci sa tým, že zvýšenie produktivity uvedeného mikroorganizmu, čo sa týka redukovaného nikotínamidadenídinukleotidfosfátu, sa dosiahne zvýšením enzymovej aktivity nikotínamidnukleotidtranshydrogenázy v bunke uvedeného mikroorganizmu.

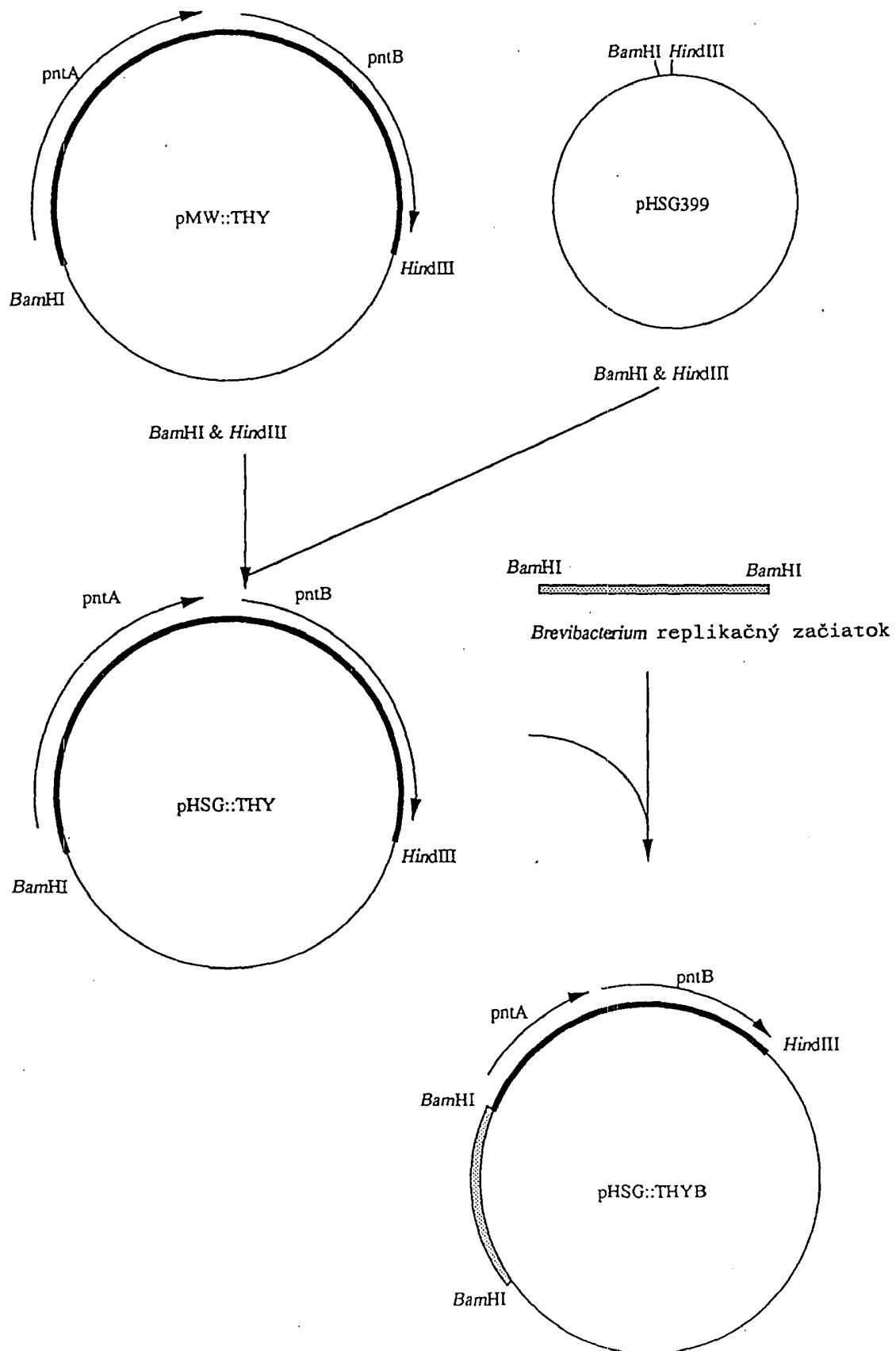
7. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 5, vyznačujúci sa tým, že zvýšenie produktivity uvedeného mikroorganizmu, čo sa týka redukovaného nikotínamidadenídinukleotidtranshydrogenázy v bunke uvedeného mikroorganizmu, sa dosiahne zvýšením enzymovej aktivity nikotínamidnukleotidtranshydrogenázy v bunke uvedeného mikroorganizmu.

značujúci sa tým, že zvýšenie produktivity uvedeného mikroorganizmu, čo sa týka redukovaného nikotínamidadeníndinukleotidfosfátu, sa dosiahne zvýšením expresie kódovania génom pre nikotínamidnukleotidtranshydrogenázu v bunke uvedeného mikroorganizmu.

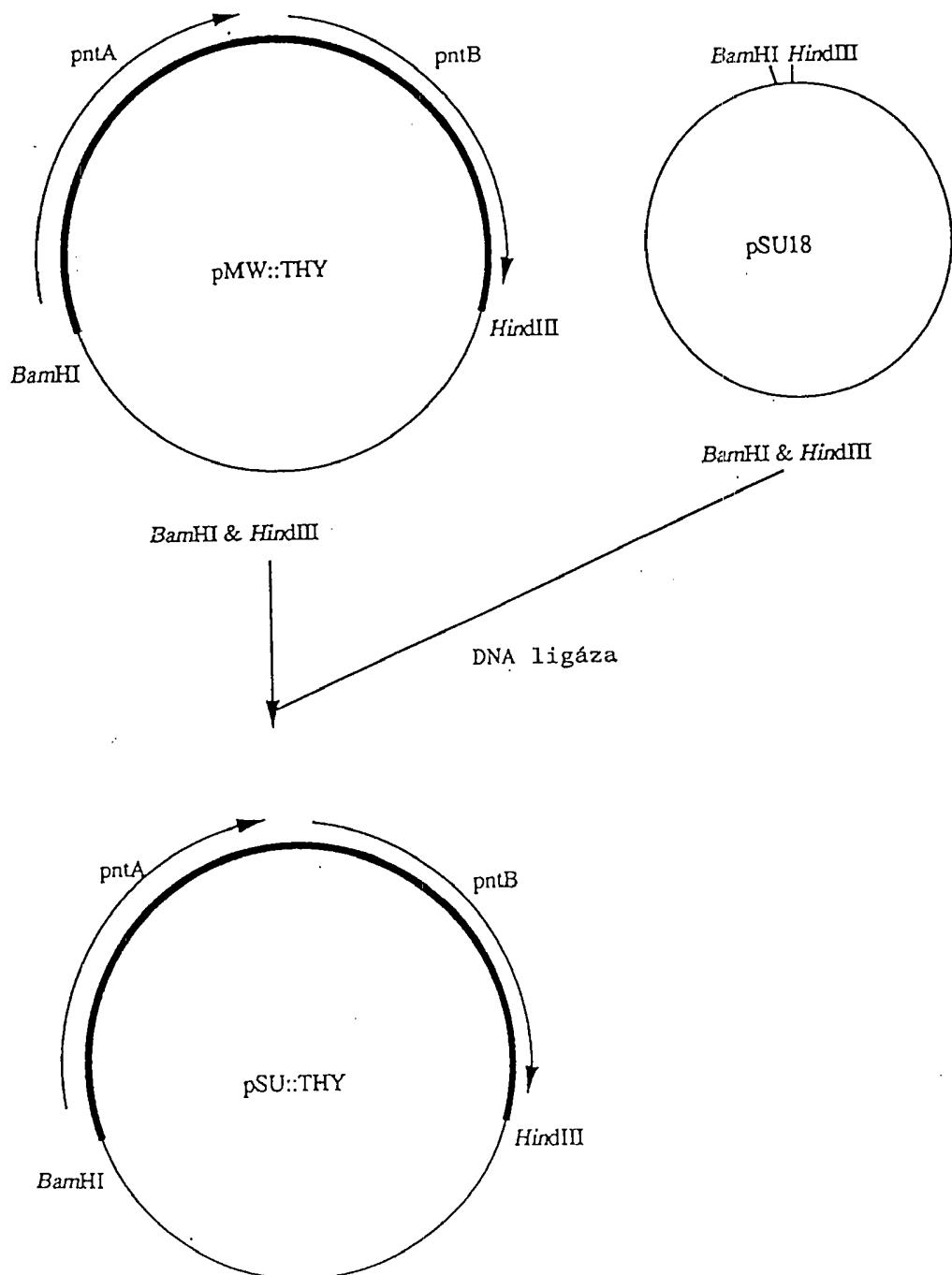
8. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 5, vyznačujúci sa tým, že zvýšenie produktivity mikroorganizmu, čo sa týka redukovaného nikotínamidadeníndinukleotidfosfátu, sa dosiahne zvýšením počtu kópií uvedeného kódovania génom pre nikotínamidnukleotidtranshydrogenázu v bunke mikroorganizmu.



OBR. 1



OBR. 2



OBR. 3