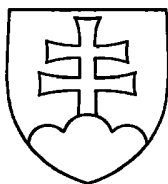


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD  
PRIEMYSELNÉHO  
VLASTNÍCTVA  
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA  
VYNÁLEZU

(21) Číslo dokumentu:

1870-99

(22) Dátum podania: 29.12.1999

(31) Číslo prioritnej prihlášky: 98124016, 99104431

(32) Dátum priority: 30.12.1998, 09.03.1999

(33) Krajina priority: RU, RU

(40) Dátum zverejnenia: 14.08.2000

(86) Číslo PCT:

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.7 :

C 12N 1/20  
C 12N 15/69  
C 07C 221/00  
C 12P 13/08  
C 12P 13/06  
C 12P 13/10  
C 12P 13/14  
C 12P 13/24

(71) Prihlasovateľ: AJINOMOTO CO., INC., Chuo-ku, Tokyo, JP;

(72) Pôvodca vynálezu: Livshits Arkadievich Vitaliy, Moscow, RU;  
Zakataeva Pavlovna Natalia, Moscow, RU;  
Nakanishi Kazuo, Sakae-ku, Yokohama-shi, JP;  
Aleshin Vladimir Veniaminovich, Borovsk, RU;  
Troshin Petr Vladimirovich, Moscow, RU;  
Tokhmakova Lyvovna Irina, Moscow, RU;

(74) Zástupca: Majlingová Marta, Ing., Bratislava, SK;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Baktéria patriaca do rodu *Escherichia* a spôsob produkcie L-aminokyseliny**

(57) Anotácia:

Je opísaná baktéria patriaca do rodu *Escherichia*, ktorá má schopnosť produkovať L-aminokyselinu, pričom schopnosť produkovať L-aminokyselinu je zvýšená prostredníctvom zvýšenia exprimovaného množstva L-aminokyselinového vylučovacieho proteínu a spôsob produkcie L-aminokyseliny s použitím baktérie.

Baktéria patriaca do rodu *Escherichia* a spôsob produkcie L-aminokyseliny

### Oblasť techniky

Tento vynález sa týka baktérie produkujúcej L-aminokyselinu, ktorá patrí do rodu *Escherichia* a spôsobu produkcie L-aminokyselín, konkrétnejšie kyseliny L-glutámovej, L-lyzínu, L-treonínu, L-alanínu, L-histidínu, L-prolínu, L-arginínu, L-valínu a L-izoleucínu s použitím baktérie.

### Doterajší stav techniky

Na výrobu L-aminokyseliny prostredníctvom fermentácie bol na zlepšenie produktivity použitý kmeň izolovaný z prirodzeného prostredia alebo umelý mutant kmeňa. Napríklad v prípade L-lyzínu je známych mnoho umelých mutantov produkujúcich L-lyzín a väčšina z nich sú mutanty rezistentné voči S-2-amino-etylcysteínu (AEC) a patria do rodu *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Bacillus* alebo *Escherichia*. Navrhnuté boli tiež rôzne techniky na zvýšenie produkcie aminokyselín, ako napríklad použitie transformantu získaného použitím rekombinantnej DNA (US patent č. 4 278 7665).

Techniky sú väčšinou založené na zvýšení aktivity enzýmu zahrnutého v biosyntetickej dráhe aminokyseliny, konverzii enzýmu tak, aby bol necitlivý voči inhibícii a podobne (pokiaľ ide o baktérie patriace do rodu *Escherichia*, pozri japonská prihláška vynálezu č. zverejnenia 56-18596 (1981) a číslo medzinárodného zverejnenia WO 95/16042).

Na druhej strane je ako príklad zlepšenia aminokyselinovej produktivity zosilnením aminokyselinového vylučovacieho proteínu, známa baktéria patriaca do rodu *Corynebacterium*, v ktorej je zosilnený L-lyzín vylučovací gén, *lysE*. Avšak pokiaľ ide o baktériu patriacu do rodu *Escherichia*, nie je známe ani či je L-aminokyselinový vylučovací proteín prítomný alebo nie. Takže nie je známe, či zosilnenie L-aminokyselinového vylučovacieho proteínu je účinné pri výrobe L-aminokyseliny, v ktorej sa používa baktéria patriaca do rodu *Escherichia* alebo nie.

Hoci už bola určená celá nukleotidová sekvencia *E. coli* kmeňa K-12 patriaceho do rodu *Escherichia* (*Science*, 277, 1453-1474 (1997)), existuje veľké množstvo proteínov, ktorých funkcie nie sú známe.

Cieľom vynálezu je získať proteín zúčastňujúci sa na vylučovaní L-aminokyseliny, a tým poskytnúť kmeň vylepšený z hľadiska L-aminokyselínovej produktivity a zlepšiť spôsob výroby L-aminokyseliny fermentáciou.

Pôvodcovia uskutočnili vyhľadávanie proteínu zúčastňujúceho sa na vylučovaní L-aminokyseliny. Výsledkom bolo zistenie, že výťažok L-aminokyseliny vzhľadom na spotrebovaný sacharid sa zvýšil, keď bol zosilnený konkrétny gén. Na základe tohto zistenia bol skompletovaný predložený vynález.

#### Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je baktéria patriacu do rodu *Escherichia*, ktorá má schopnosť produkovať L-aminokyselinu, pričom schopnosť produkovať L-aminokyselinu je zvýšená prostredníctvom zvýšenia exprimovaného množstva najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny, ktorá pozostáva z nasledujúcich proteínov (A) až (H) (ďalej označovaná aj ako "baktéria podľa predloženého vynálezu"):

(A) proteín, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu uvedenú v Zozname sekvencií ako sekv. č.: 10;

(B) proteín, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu, vrátane delécie, substitúcie, inzercie, pridania alebo inverzie jednej alebo niekoľkých aminokyselín, v aminokyselinovej sekvencii uvedenej v Zozname sekvencií ako sekv. č.:10, a ktorý zabezpečuje, že baktéria, ktorá ho obsahuje, má zvýšenú schopnosť produkovať L-aminokyselinu;

(C) proteín, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu uvedenú v Zozname sekvencií ako sekv. č.: 12;

(D) proteín, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu, vrátane delécie, substitúcie, inzercie, pridania alebo inverzie jednej alebo niekoľkých aminokyselín, v aminokyselinovej sekvencii uvedenej v Zozname sekvencií ako sekv. č.:12, a

ktorý zabezpečuje, že baktéria, ktorá ho obsahuje, má zvýšenú schopnosť produkovať L-aminokyselinu;

(E) proteín, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu uvedenú v Zozname sekvencií ako sekv. č.: 14;

(F) proteín, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu, vrátane delécie, substitúcie, inzercie, pridania alebo inverzie jednej alebo niekoľkých aminokyselín, v aminokyselinovej sekvencii uvedenej v Zozname sekvencií ako sekv. č.:14, a ktorý zabezpečuje, že baktéria, ktorá ho obsahuje, má zvýšenú schopnosť produkovať L-aminokyselinu;

(G) proteín, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu uvedenú v Zozname sekvencií ako sekv. č.: 16; alebo

(H) proteín, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu, vrátane delécie, substitúcie, inzercie, pridania alebo inverzie jednej alebo niekoľkých aminokyselín, v aminokyselinovej sekvencii uvedenej v Zozname sekvencií ako sekv. č.:16, a ktorý zabezpečuje, že baktéria, ktorá ho obsahuje, má zvýšenú schopnosť produkovať L-aminokyselinu.

Baktériou podľa predloženého vynálezu je výhodne L-lyzín produkujúca baktéria, v ktorej je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (A) až (D), (G) a (H); kyselinu L-glutámovú produkujúca baktéria, v ktorej je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (A) až (H); L-alanín produkujúca baktéria, v ktorej je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (C) a (D); L-valín produkujúca baktéria, v ktorej je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (C) a (D); L-histidín produkujúca baktéria, v ktorej je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (C) až (F); L-prolín produkujúca baktéria, v ktorej je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (A) až (F); L-treonín produkujúca baktéria, v ktorej je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (E) a

(F); L-arginín produkujúca baktéria, v ktorej je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (G) a (H); alebo L-izoleucín produkujúca baktéria, v ktorej je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (C) a (D).

Výhodne je v baktérii podľa predloženého vynálezu zvýšený počet kópií DNA kódujúcej uvedený proteín. DNA je výhodne nesená v bunke na multikópiovom vektore alebo na transpozóne.

Predložený vynález poskytuje aj spôsob produkcie L-aminokyseliny, ktorý zahŕňa nasledujúce kroky:

- kultiváciu baktérie podľa predloženého vynálezu v kultivačnom médiu, aby sa produkovala a akumulovala L-aminokyselina v médiu, a
- izolovanie L-aminokyseliny z média,

(tu ďalej označovaný ako "spôsob podľa predloženého vynálezu").

Spôsobom podľa predloženého vynálezu je výhodne spôsob produkcie L-lyzínu použitím L-lyzín produkujúcej baktérie, v ktorej je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (A) až (D), (G) a (H); spôsob produkcie kyseliny L-glutámovej použitím kyselínu L-glutámovú produkujúcej baktérie, v ktorej je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (A) až (H); spôsob produkcie L-alanínu použitím L-alanín produkujúcej baktérie, v ktorej je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (C) a (D); spôsob produkcie L-valínu použitím L-valín produkujúcej baktérie, v ktorej je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (C) a (D); spôsob produkcie L-histidínu použitím L-histidín produkujúcej baktérie, v ktorej je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (C) až (F); spôsob produkcie L-prolínu použitím L-prolín produkujúcej baktérie, v ktorej je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (A) až (F); spôsob produkcie L-treonínu použitím L-treonín produkujúcej

baktérie, v ktorej je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (E) a (F); spôsob produkcie L-arginínu použitím L-arginín produkujúcej baktérie, v ktorej je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (G) a (H); alebo spôsob produkcie L-izoleucínu použitím L-izoleucín produkujúcej baktérie, v ktorej je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (C) a (D).

Výhodne je pri spôsobe podľa predloženého vynálezu zvýšený počet kópií DNA kódujúcej uvedený proteín v bunke baktérie. DNA je v bunke výhodne nesená multikópiovým vektorom alebo na transpozóne.

Podľa predloženého vynálezu je možné zvýšiť schopnosť baktérie patriacej do rodu *Escherichia* produkovať L-aminokyselinu. Môže byť zlepšený aj spôsob produkcie L-aminokyseliny zlepšením výkonnosti produkcie L-aminokyseliny.

Predložený vynález bude podrobne vysvetlený nižšie. Nižšie, ak nie je uvedené inak, je aminokyselina v L-konfigurácii.

#### (1) Baktéria podľa predloženého vynálezu

Baktéria podľa predloženého vynálezu je baktéria patriaca do rodu *Escherichia*, majúca schopnosť produkovať aminokyselinu, v ktorej je schopnosť produkovať aminokyselinu zvýšená prostredníctvom zvýšenia exprimovaného množstva proteínu zabezpečujúceho zvýšenie schopnosti baktérie produkovať aminokyselinu alebo zvýšenie rezistencie voči aminokyseline alebo aminokyselinovému analógu. Nižšie je proteín označovaný ako "aminokyselinový vylučovací proteín", aby sa zabezpečila zrozumiteľnosť. Avšak tento výraz neznamená, že funkcia proteínu je obmedzená na vylučovanie aminokyseliny.

Príklady aminokyselinového vylučovacieho proteínu zahŕňajú proteín, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu uvedenú ako sekv. č.: 10; proteín, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu uvedenú ako sekv. č. 12; proteín, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu uvedenú ako sekv. č. 14; a proteín, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu uvedenú ako sekv. č. 16.

Aminokyselinový vylučovací proteín môže byť selektívny pre aminokyselinu. Aminokyselinový vylučovací proteín vhodný pre konkrétnu aminokyselinu je možné určiť tak, že sa umožní, aby sa aminokyselinový vylučovací proteín exprimoval v baktérii patriacej do rodu *Escherichia*, majúcej schopnosť produkovať aminokyselinu, a meria sa zvýšenie výťažku aminokyseliny, alebo sa meria zvýšenie minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) aminokyseliny alebo analógu aminokyseliny.

Napríklad, v prípade lyzínu je účinný proteín, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu uvedenú ako sekv. č: 10, 12 alebo 16; v prípade kyseliny glutámovej je účinný proteín, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu uvedenú ako sekv. č: 10, 12, 14 alebo 16; v prípade alanínu je účinný proteín, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu uvedenú ako sekv. č: 12; v prípade valínu je účinný proteín, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu uvedenú ako sekv. č: 12; v prípade histidínu je účinný proteín, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu uvedenú ako sekv. č: 12 alebo 14; v prípade prolínu je účinný proteín, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu uvedenú ako sekv. č: 10, 12 alebo 14; v prípade treonínu je účinný proteín, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu uvedenú ako sekv. č: 14; v prípade arginínu je účinný proteín, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu uvedenú ako sekv. č: 16; v prípade izoleucínu je účinný proteín, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu uvedenú ako sekv. č: 12.

Tu používaný výraz "exprimované množstvo je zvýšené" zvyčajne znamená, že exprimované množstvo je vyššie ako množstvo v divom kmeni *E. coli*, ako napríklad v kmeni MG1655 alebo W3110. Výraz tiež znamená, že ak je kmeň získaný modifikáciou technikami genetického inžinierstva alebo podobnými technikami, je exprimované množstvo vyššie ako exprimované množstvo pred modifikáciou. Exprimované množstvo aminokyselinového vylučovacieho proteínu je možné určiť priamo alebo nepriamo, determináciou MIC aminokyseliny alebo aminokyselinového analógu alebo determináciou produktivity aminokyseliny baktériou patriacou do rodu *Escherichia*, ktorá obsahuje aminokyselinový vylučovací proteín.

Príkladom spôsobu na zvyšovanie exprimovaného množstva aminokyselinového vylučovacieho proteínu je spôsobom zvyšovania počtu kópií DNA kódujúcej aminokyselinový vylučovací proteín v bunke baktérie.

Na zvýšenie počtu kópií v bunke je možné ligovať fragment DNA kódujúci aminokyselinový vylučovací proteín do vektora, ktorý je funkčný v baktérii patriacej do rodu *Escherichia*, aby sa vytvorila rekombinantná DNA, ktorá je zavádzaná do hostiteľa na jeho transformáciu. Počet kópií génu kódujúceho aminokyselinový vylučovací proteín (gén aminokyselinového vylučovacieho proteínu) v bunke transformovaného kmeňa sa zvyšuje, čím sa zvyšuje exprimované množstvo aminokyselinového vylučovacieho proteínu. Vektor je výhodne multikópiový vektor.

Zvýšenie počtu kópií v bunke je možné dosiahnuť tým, že sa umožní, aby existovali viacnásobné kópie génu aminokyselinového vylučovacieho proteínu na chromozomálnej DNA hostiteľa. Zavedenie viacnásobných kópií génu aminokyselinového vylučovacieho proteínu do chromozomálnej DNA baktérie patriacej do rodu *Escherichia* je možné uskutočniť prostredníctvom homologickej rekombinácie tak, že sa ako cieľ použije sekvencia, ktorá v chromozomálnej DNA existuje vo viacnásobných kópiách. Ako sekvencia, ktorá existuje v chromozomálnej DNA vo viacnásobných kópiách, môže byť použitá opakujúca sa DNA a inverzné opakovanie prítomné v koncovej časti transponovateľného elementu.

Alternatívne, ako je opísané v japonskej prihláške vynálezu publikovanej pod číslom 2-109985 (1990), viacnásobné kópie je možné zaviesť do chromozomálnej DNA tak, že sa zabezpečí, aby bol gén aminokyselinového vylučovacieho proteínu nesený na transpozóne, a umožní sa, aby sa transpozón transponoval, čo je výhodné. Podľa ktorejkoľvek z vyššie uvedených metód sa zvyšuje počet kópií génu aminokyselinového vylučovacieho proteínu v transformovanom kmeni, čím sa zvyšuje exprimované množstvo aminokyselinového vylučovacieho proteínu.

Príkladmi multikópiového vektora sú plazmidové vektory, ako napríklad pBR322, pMW118, pUC19 alebo podobné, a fágové vektory, ako napríklad  $\lambda$ 1059,  $\lambda$ BF101, M13mp9 alebo podobné. Príkladmi transpozónu sú Mu, Tn10, Tn5 alebo podobné.



Zavedenie DNA do baktérie patriacej do rodu *Escherichia* sa môže uskutočniť napríklad spôsobom podľa D. M. Morrisona (Methods in Enzymology 68, 326 (1979)) alebo spôsobom, podľa ktorého sa recipientné bakteriálne bunky ošetrí s chloridom vápenatým, aby sa zvýšila permeabilita DNA (Mandel, M. a Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)) a podobne.

Okrem vyššie uvedenej génovej amplifikácie je možné dosiahnuť zvýšenie exprimovaného množstva aminokyselinového vylučovacieho proteínu aj zámenou expresnej regulačnej sekvencie, ako napríklad promótoru génu aminokyselinového vylučovacieho proteínu silnejším promótorom (pozri japonská prihláška vynálezu zverejnená pod číslom 1-215280 (1989)). Ako silné promótory sú známe napríklad *lac* promótor, *trp* promótor, *tac* promótor, P<sub>R</sub> promótor a P<sub>L</sub> promótor. Zámena promótoru zosiluje expresiu aminokyselinového vylučovacieho proteínu, čím sa zvyšuje exprimované množstvo aminokyselinového vylučovacieho proteínu. Posilnenie expresnej regulačnej sekvencie môže byť kombinované so zvýšením počtu kópií génu aminokyselinového sekrečného proteínu.

V baktérii podľa predloženého vynálezu je možné zvýšiť exprimované množstvá viacerých aminokyselinových vylučovacích proteínov.

Aminokyselinový vylučovací proteín je kódovaný génmi, ktoré sú známe ako *yahN* gén, *yeaS* gén, *yfiK* gén a *yggA* gén, a ktorých funkcie sú neznáme. Preto je možné získať DNA kódujúcu aminokyselinový vylučovací proteín prostredníctvom syntetizovania primerov na základe známych sekvencií (napríklad, už bola určená celá nukleotidová sekvencia chromozómu *Escherichia coli* kmeňa K-12 (Science, 277, 1453-1474 (1997))), a uskutočnením PCR amplifikácie použitím chromozomálnej DNA baktérie patriacej do rodu *Escherichia* ako templátu. Predmetný DNA fragment môže byť tiež vybraný hybridizáciou z chromozomálnej DNA knižnice baktérie patriacej do rodu *Escherichia* pripravením sondy na základe známych sekvencií. Alternatívne môže byť DNA kódujúca aminokyselinový vylučovací proteín syntetizovaná na základe známych sekvencií. Príklady nukleotidovej sekvencie DNA kódujúcej aminokyselinový vylučovací proteín sú uvedené v Zozname sekvencií ako sekv. č.: 9, 11, 13 alebo 15.

Spôsoby prípravy chromozomálnej DNA, prípravy chromozomálnej DNA knižnice, hybridizácie, PCR, prípravy plazmidovej DNA, štiepenia a ligácie DNA, transformácie, výberu oligonukleotidov ako primerov a podobne, sú bežnými metódami, ktoré sú dobre známe odborníkovi v oblasti. Tieto metódy sú opísané v Sambrook, J., Fritsch, E. F., a Maniatis, T., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) a podobne.

Aminokyselinový vylučovací proteín môže obsahovať substitúcie, delécie, inzercie, pridanie alebo inverzie jednej alebo niekoľkých aminokyselín v jednej alebo vo viacerých polohách, s podmienkou, že nie je znehodnotená zvýšená schopnosť baktérie patriacej do rodu *Escherichia* a majúcej tento proteín, produkovať aminokyselinu. Výraz "niekoľko" sa môže meniť v závislosti na polohe v priestorovej štruktúre proteínu a na druhu aminokyselinového zvyšku. Je to z toho dôvodu, že niektoré aminokyseliny, ako napríklad izoleucín a valín, sú navzájom veľmi podobné a rozdiel medzi takýmito aminokyselinami veľmi neovplyvní priestorovú štruktúru proteínu.

DNA, ktorá kóduje v podstate rovnaký proteín ako aminokyselinový vylučovací proteín opísaný vyššie, je možné získať, napríklad, modifikáciou nukleotidovej sekvencie, napríklad, prostredníctvom spôsobu miestne-špecifickej mutagenézy tak, aby jeden alebo viacero aminokyselinových zvyškov na konkrétnom mieste zahŕňalo substitúciu, deléciu, inzerciu, pridanie alebo inverziu. DNA modifikovanú tak, ako je opísané vyššie, je možné získať bežne známym mutačným postupom. Mutačný postup zahŕňa spôsob *in vitro* ošetrenia DNA kódujúcej aminokyselinový vylučovací proteín, napríklad s hydroxylamínom a spôsob ošetrenia mikroorganizmu, napríklad, baktérie patriacej do rodu *Escherichia*, nesúcej DNA, ktorá kóduje aminokyselinový vylučovací proteín, ultrafialovým žiarením alebo mutačným činidlom, ako napríklad N-metyl-N'-nitro-N-nitrozoguanidínom (NG) a kyselinou dusitou, ktoré sa zvyčajne používajú na mutačné pôsobenie.

Substitúcia, delécia, inzercia, pridanie alebo inverzia jednej alebo viacerých aminokyselinových zvyškov zahŕňa prirodzene sa vyskytujúcu mutáciu alebo odchýlku, ktorá vyplýva z rozdielu medzi jednotlivými mikroorganizmami, ktoré majú

aminokyselinový vylučovací proteín a z rozdielu medzi druhmi, kmeňmi, alebo podobne.

DNA, ktorá kóduje v podstate rovnaký proteín ako aminokyselinový vylučovací proteín, je možné získať tak, že sa umožní, aby sa DNA, majúca vyššie opísanú mutáciu, exprimovala v bunke príslušnej baktérie patriacej do rodu *Escherichia*, a pátra sa po zvýšení aminokyselinovej produktivity bunky.

DNA, ktorá kóduje v podstate rovnaký proteín ako aminokyselinový vylučovací proteín, sa dá získať aj izolovaním DNA, ktorá hybridizuje s DNA, ktorá má, napríklad, nukleotidovú sekvenciu uvedenú v Zozname sekvencií ako sekv. č.: 9, 11, 13 alebo 15, v prísnych podmienkach, a ktorá kóduje proteín, ktorý zvyšuje schopnosť baktérie patriacej do rodu *Escherichia* produkovať aminokyselinu, z DNA kódujúcich aminokyselinové vylučovacie proteíny, ktoré majú mutácie, alebo z buniek obsahujúcich tieto DNA. Výraz "prísne podmienky" tu znamená podmienky, v ktorých sa vytvára špecifický hybrid a nevytvára sa nešpecifický hybrid. Je ťažké jasne špecifikovať tieto podmienky použitím akýchkoľvek číselných hodnôt. Prísne podmienky, napríklad, zahŕňajú podmienky, v ktorých DNA s vysokou homológiu, napríklad DNA so vzájomnou homológiu nie nižšou ako 70% hybridizujú, a DNA so vzájomnou homológiu nižšou ako 70% nehybridizujú, alebo podmienky, v ktorých koncentrácia soli zodpovedá pri 60 °C 1 x SSC, 0,1 % SDS, výhodne 0,1 x SSC, 0,1 % SDS, čo sú premývacie podmienky bežnej Southernovej hybridizácie.

Hoci medzi génmi, ktoré hybridizujú v takýchto podmienkach, môže byť gén, v ktorom je stop kodón vytvorený v strede, alebo gén kódujúci proteín, ktorý stratil aktivitu v dôsledku mutácie aktívneho centra, tieto sa dajú jednoducho eliminovať ligáciou génov z komerčne dostupným aktivitovým expresným vektorom a určením zvýšenej schopnosti baktérie patriacej do rodu *Escherichia* produkovať aminokyselinu, ako bolo opísané vyššie.

Tu použitý výraz "DNA kódujúci proteín" znamená, DNA, ktorej jedno z vláknien kóduje proteín, ak je DNA dvojláknová.

Zvýšením exprimovaného množstva aminokyselinového vylučovacieho proteínu v baktérii produkujúcej aminokyselinu, ktorá patrí do rodu *Escherichia*, ako bolo opísané vyššie, je možné zvýšiť produkované množstvo aminokyseliny. Ako

baktéria patriaca do rodu *Escherichia*, v ktorej má byť zvýšené exprimované množstvo aminokyselinového vylučovacieho proteínu, sú použité kmene, ktoré majú schopnosť produkovať požadované aminokyseliny (aminokyselinové produktivity). Okrem toho môže byť schopnosť produkovať aminokyselinu dodaná baktérii, v ktorej je zvýšené exprimované množstvo aminokyselinového vylučovacieho proteínu. Príklady baktérií produkujúcich aminokyselinu, ktoré patria do rodu *Escherichia*, zahŕňajú *E. coli* AJ13199 (francúzsky patent č. 2747689) a tie, ktoré je možné získať zo známych materiálov (napr. *E. coli* W3110 (*tyrA*)/pCABD2, *E. coli* VL614, *E. coli* VL2054, *E. coli* VL2160, *E. coli* VL2151, *E. coli* W3350 *argE::Tn10/pKA10* ako je opísané nižšie, v príkladoch).

Prvýkrát bol aminokyselinový vylučovací proteín podľa predloženého vynálezu identifikovaný ako je opísané nižšie.

Pôvodcovia predloženého vynálezu identifikovali *rhtB* a *rhtC* ako gény treonínového vylučovacieho proteínu baktérie patriacej do rodu *Escherichia*. Pôvodcovia prehľadávali databázy na základe hypotézy, že aminokyselinové vylučovacie proteíny môžu zdieľať spoločnú štruktúru. Konkrétne sa uskutočnilo BLAST a PSI-BLAST prehľadávanie (Altschul, S. F. et al., *Nucleic Acids Res.*, 25, 3389-3402 (1997)) na základe homológie proteínu kódovaného *rhtB* v GenBank CDS, PDB, SWISS-PROT, Spupdate a PIR. Tblastn prieskum sa uskutočnil v nedokončených mikrobiálnych genómoch. BLITZ prieskum (Sturrock, S. S., a Collins, J. F., Mpsch verzia 1.3. Biocomputing research unit University of Edinburgh, UK (1993)) sa uskutočnil v SWALL databáze. SMART prieskum (Ogiwara, I. et al., *Protein Sci.*, 5, 1991-1999 (1996)) sa uskutočnil v databázach translácií a SWISS-PROT. Zo vzoriek viac ako 60 sekvencií ostali YeaS (zodpovedajúci f212, prístupové č. AE000274 v GenBank), YahN (zodpovedajúci f223, prístupové č. AE000140 v GenBank), YfiK (zodpovedajúci o195, prístupové č. AE000344 v GenBank) a YggA (zodpovedajúci f211, prístupové č. AE000375 v GenBank) ako proteíny, ktoré môžu mať podobnú funkciu ako RhtB, z tých proteínov, ktoré pochádzajú z *E. coli*. Keďže funkcie ktoréhokoľvek z týchto génov boli neznáme, skúmali sa účinky skutočne získaných génov na MIC aminokyselín a aminokyselinových analógov a na produkciu aminokyselín, prostredníctvom zosilnenia ich

aktivít. Výsledkom bolo, že sa zistil účinok zvyšujúci MIC niektorých aminokyselín a analógov vo vzťahu k YeaS, YfiK, YahN a YggA. Ďalšie skúmanie odhalilo, že proteíny kódované týmito génmi vykazujú účinok, ktorý zvyšuje akumuláciu aminokyseliny, hoci môžu byť selektívne voči niektorým aminokyselinám.

## (2) Spôsob podľa predloženého vynálezu

Spôsob podľa predloženého vynálezu zahŕňa kroky kultivácie baktérie podľa predloženého vynálezu v kultivačnom médiu, aby sa v médiu vyprodukovala a akumulovala aminokyselina, a izolácie aminokyseliny z média.

Vhodné aminokyseliny zahŕňajú lyzín, kyselinu glutámovú, alanín, valín, histidín, prolín a treonín, arginín a izoleucín.

V spôsobe podľa predloženého vynálezu sa môže kultivácia baktérie patriacej do rodu *Escherichia*, zozbieranie a purifikácia aminokyseliny z kvapalného média, uskutočňovať spôsobom, ktorý je podobný s bežným spôsobom produkcie aminokyseliny fermentáciou použitím baktérie. Médium použitým na kultiváciu môže byť buď syntetické médium alebo prirodzené médium, pokiaľ médium obsahuje zdroj uhlíka a dusíka a minerály, a ak je to nevyhnuté nutričné látky, ktoré použitá baktéria potrebuje pre rast v príslušnom množstve. Zdroj uhlíka môže zahŕňať rôzne karbohydráty, ako napríklad glukózu a sacharózu, a rôzne organické kyseliny. V závislosti na asimilačnej schopnosti použitej baktérie môže byť použitý alkohol vrátane etanolu a glycerolu. Ako zdroj dusíka môžu byť použité amoniak, rôzne amónne soli, ako napríklad síran amónny, iné dusíkové zlúčeniny, ako napríklad amíny, prirodzené zdroje dusíka, ako napríklad peptón, sójový hydrolyzát a poštiepený fermentatívny mikroorganizmus. Ako minerály sú použité fosforečnan draselný, síran horečnatý, chlorid sodný, síran železnatý, síran manganatý, uhličitan vápenatý.

Kultivácia je výhodne kultúra v aeróbnom stave, ako napríklad pretrepávaná kultúra, a prevzdušená a miešaná kultúra. Teplota kultúry je zvyčajne 20 až 40 °C, výhodne 30 až 38 °C. pH kultúry je zvyčajne medzi 5 a 9, výhodne medzi 6,5 a 7,2.

pH kultúry je možné nastaviť amoniakom, uhličitanom vápenatým, rôznymi kyselinami, rôznymi zásadami a tlmivými roztokmi. 1 až 3 dni kultivácie zvyčajne vedú ku akumulácii cieľovej aminokyseliny v médiu.

Izolácia aminokyseliny sa môže uskutočňovať po kultivácii odstránením pevných zložiek, ako napríklad buniek, z média centrifugáciou alebo membránovou filtráciou, a potom zozbieranie a purifikáciu cieľovej aminokyseliny iónovou výmenou metódou, koncentračnou metódou a kryštálovou frakčnou metódou a podobne.

Predložený vynález bude konkrétnejšie vysvetlený nižšie, s odvolaním sa na príklady.

### Príklady uskutočnenia vynálezu

#### Príklad 1

#### Príprava DNA fragmentov, ktoré kódujú aminokyselinové vylučovacie proteíny

Bola stanovená celá nukleotidová sekvencia chromozómu *E. coli* kmeňa K-12 (Science, 277, 1453-1474, 1997). Na základe publikovanej nukleotidovej sekvencie boli syntetizované primery a prostredníctvom PCR sa amplifikovali gény *yahN*, *yfiK*, *yeaS* a *yggA*.

#### 1) Chromozomálna DNA *E. coli* kmeňa MG1655 sa použila ako templát

Chromozomálna DNA sa pripravila bežným spôsobom (Sambrook, J., Fritsch E. F. a Maniatis T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2. vyd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.). Pri PCR reakcii boli použité štandardné podmienky opísané v "PCR protocols. Current methods and applications" (White, B.A., vyd. Humana Press, Totowa, New Jersey, 1993). Získané PCR produkty sa purifikovali bežným spôsobom a štiepili sa restriktívnymi enzýmami ako je opísané nižšie.

*YahN* gén sa amplifikoval použitím primerov č. 1 a č. 2.

Primer č. 1: ggtggaacc gacgccgat (sekvencia komplementárna so sekvenciou od bázy 1885 po bázu 1904 v nukleotidovej sekvencii registrovanej pod prístupovým č. AE000140 v GenBank; sekv. č.: 17), a

Primer č. 2: tgtgtatgg tacgggggtc gag (sekvencia od bázy 223 po bázu 245 v rovnakej sekvencii ako bolo uvedené vyššie; sekv. č.: 18).

Získaný PCR produkt bol po purifikácii štiepený restriktívnymi enzýmami *Pst*I a *Stu*I a ligoval sa do vektora pUC21 (Vieira, Messing, Gene, 100, 189-194, 1991) poštiepeným enzýmami *Pst*I a *Eco*RV, použitím ligačného kitu. Potom sa uskutočnila transformácia kompetentných buniek *E. coli* TG1 (Sambrook, J., Fritsch E. F. a Maniatis T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2. vyd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.) produktom, a bunky sa vysiali na L médium (10 g/l Bacto tryptónu, 5 g/l kvasinkového extraktu, 5 g/l NaCl, 15 g/l agaru, pH 7,0) s obsahom 10 µg/ml IPTG (izopropyl-β-D-tiogalaktopyranozid) a 40 µg/ml X-gal (5-bróm-4-chlór-3-indolyl-β-D-galaktózid) a 100 µg/ml ampicilínu, a kultivovali sa cez noc. Vzniknuté biele kolónie sa odpichli a podrobili sa jednokolóniovej izolácii, aby sa získali transformanty. Z transformantov sa pripravil plazmid použitím spôsobu alkalického extrakcie a bol označený ako pYAHN.

*Yea*S gén sa amplifikoval použitím primerov č. 3 a č. 4.

Primer č. 3: cttgccaat cccgtctccc (sekvencia komplementárna so sekvenciou od bázy 7683 po bázu 7702 v nukleotidovej sekvencii registrovanej pod prístupovým č. AE000274 v GenBank; sekv. č.: 19);

Primer č. 4: gccccatgca taacggaaag (sekvencia od bázy 5542 po bázu 5561 v rovnakej sekvencii ako bolo uvedené vyššie; sekv. č.: 20).

Získaný PCR produkt bol po purifikácii štiepený restriktívnym enzýmom *Ava*I a ligoval sa do vektora pUC19. Po transformácii *E. coli* TG1 ako bolo opísané vyššie, sa získal plazmid označený ako pYEAS.

*Yfi*K gén sa amplifikoval použitím primerov č. 5 a č. 6.

Primer č. 5: gaagatcttg taggccgat aaggcg (sekvencia komplementárna so sekvenciou od bázy 4155 po bázu 4177 v nukleotidovej sekvencii registrovanej pod

prístupovým č. AE000344 v GenBank, s pridaným miestom pre restričný enzým *BglII* na jej 5'-koniec; sekv. č.: 21);

Primer č. 6: *tggtttacc aattggccgc* (sekvencia komplementárna s vyššie uvedenou sekvenciou od bázy 6307 po bázu 6326; sekv. č.: 22).

Získaný PCR produkt bol po purifikácii štiepený restričnými enzýmami *BglII* a *MunI* a ligoval sa do vektora pUC21 poštiepeného restričnými enzýmami *BglII* a *EcoRI*. Po transformácii *E. coli* TG1 ako bolo opísané vyššie, sa získal plazmid označený ako pYFIK.

*YggA* gén sa amplifikoval použitím primerov č. 7 a č. 8.

Primer č. 7: *acttctcccg cgagccagtt c* (sekvencia komplementárna so sekvenciou od bázy 9606 po bázu 9626 v nukleotidovej sekvencii registrovanej pod prístupovým č. AE000375 v GenBank; sekv. č.: 23);

Primer č. 8: *ggcaagctta ggcctctgt t* (sekvencia komplementárna s vyššie uvedenou sekvenciou od bázy 8478 po bázu 8498; sekv. č.: 24).

Získaný PCR produkt bol po purifikácii štiepený restričnými enzýmami *HindIII* a *Clal* a ligoval sa do vektora pOK12 (Vieira, Messing, Gene, 100, 189-194, 1991) poštiepeného rovnakými restričnými enzýmami. Po transformácii *E. coli* TG1 ako bolo opísané vyššie, sa získal plazmid označený ako pYGGA.

## 2) Ako templát bola použitá chromozomálna DNA *E. coli* kmeňa W3110

*YahN* gén sa amplifikoval použitím primerov č. 9 (sekv. č. 1) a č. 10 (sekv. č. 2).

*YeaS* gén sa amplifikoval použitím primerov č. 11 (sekv. č. 3) a č. 12 (sekv. č. 4).

*YfiK* gén sa amplifikoval použitím primerov č. 13 (sekv. č. 5) a č. 14 (sekv. č. 6).

*YggA* gén sa amplifikoval použitím primerov č. 15 (sekv. č. 7) a č. 16 (sekv. č. 8).

Získaný PCR produkt sa purifikoval, štiepil sa s restričnými enzýmami *SacI* a *XbaI* (*EcoRI* a *PstI* pre *yggA*) a ligoval sa do plazmidu pMW118 (Nippon Gene).



Plazmidy, do ktorých boli zavedené DNA fragmenty, ktorých sekvencie boli identická s uvedenými sekvenciami, boli označené nasledovne:

plazmid nesúci *yahN*: pMW118::*yahN*

plazmid nesúci *yeaS*: pMW118::*yeaS*

plazmid nesúci *yfiK*: pMW118::*yfiK*

plazmid nesúci *yggA*: pMW118::*yggA*

## Príklad 2

Účinok amplifikácie *yahN*, *yeaS*, *yfiK* a *yggA* DNA fragmentov na *E. coli* TG1 rezistenciu k niektorým aminokyselinám a aminokyselinovým analógom

Homológia *yeaS*, *yfiK*, *yahN* a *yggA* génových produktov s lyzínovým transportérom, LysE z *Corynebacterium glutamicum* (Vrljic et al., Mol. Microbiol., 22, 815-826, 1996) a RhtB proteínom zúčastňujúcim sa na vylučovaní homoserínu, naznačuje analogické funkcie týchto proteínov. Je dobre známe, že zvýšenie expresie génov, zúčastňujúcich sa na vyplavovaní antibiotík a ťažkých kovov, zvyšuje úroveň rezistencie voči liečivám (Nikaido, H.J. Bacteriology, 178, 5853-5859, 1996). Preto bol testovaný účinok pYEAS, pYAHN, pYFIK, a pYGGA plazmidov na náchylnosť kmeňa TG1 ku niektorým aminokyselinám a aminokyselinovým analógom. Nočné kultúry *E. coli* kmeňov TG1/pYEAS, TG1/pYAHN, TG1/pYFIK, TG1/pYGGA a kontrolných kmeňov TG1/pUC21, TG1/pUC19 a TG1/pOK12 vyrastených v M9 minimálnom médiu s príslušným antibiotikom na rotačnej trepačke ( $10^9$  cfu/ml) sa nariedili v pomere 1:100 v M9 minimálnom médiu a rástli 5 hodín v rovnakom médiu. Takto získané kultúry v logaritmickej fáze sa potom nariedili a približne  $10^4$  živých buniek sa aplikovalo na dobre vysušené testovacie platne s M9 agarom obsahujúcom dvojnásobne sa zvyšujúce množstvá aminokyselín alebo analógov. Tak boli skúmané minimálne inhibičné koncentrácie (MIC) týchto zlúčenín.

Výsledky sú uvedené v tabuľke 1. Z tabuľky 1 vyplýva, že viacnásobné kópie *yfiK* génu zvyšujú rezistenciu ku prolínu, homoserínu, histidínu, treonínu, glutamátu, lyzínu,  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hydroxyvalérovej kyseliny (AHV), S-(2-aminoetyl)-L-cysteínu

(AEC) a  $\alpha$ -aminobutyrovej kyseliny; viacnásobné kópie *yahN* génu zvyšujú rezistenciu ku prolínu, viacnásobné kópie *yeaS* génu zvyšujú rezistenciu ku treonínu, homoserínu, lyzínu, glutamátu, histidínu, prolínu a ku  $\alpha$ -aminobutyrovej kyseliny; viacnásobné kópie *yggA* génu zvyšujú rezistenciu ku S-(2-aminoetyl)-L-cysteínu (AEC), lyzínu, a arginínu. Z týchto výsledkov vyplýva, že okrem YahN, každý z predpokladaných transportérov má špecifickosť k niekoľkým substrátom (aminokyselinám a aminokyselinovým analógom) alebo môže, ako výsledok amplifikácie, vykazovať nešpecifické účinky.

Tabuľka 1

Substrát	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) pre <i>E. coli</i> TG1, ktorá obsahuje plazmid				
	pUC21	pYFIK	pYAHN	pYEAS	pYGGA
L-homoserín	500	1000	500	1000	500
L-treonín	30000	40000	30000	50000	30000
L-lyzín	5000	7500	5000	7500	15000
L-glutamát (sodná soľ)	5000	10000	5000	20000	5000
L-histidín	5000	10000	5000	30000	5000
L-valín	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
L-prolín	1000	5000	2000	2000	1000
L-arginín	10000	10000	10000	10000	20000
AHVA	100	200	100	100	100
AEC	5	10	5	5	200
$\alpha$ -aminobutyrová kyselina	2500	5000	2500	>10000	2500
4-aza-DL-leucín	100	100	100	100	100

### Príklad 3

Účinok amplifikácie *yeaS*, *yahN* a *yfiK* DNA fragmentov na produkciu kyseliny glutámovej

*E. coli* kmeň AJ13199 (FR patent č. 2747589) sa transformoval vektorom pUC21 a každým z plazmidov pYAHN, pYEAS a pYFIK. Tak sa získali kmene AJ13199/pUC21 (VKPM B-7728), AJ13199/pYAHN (VKPM B-7729), AJ13199/pYEAS (VKPM B-7731) a AJ13199/pYFIK (VKPM B-7730).

Z týchto kmeňov sa každý kultivoval pri 37 °C 18 hodín v nutričnom médiu so 100 mg/l ampicilínu a 0,3 ml získanej kultúry sa inokulovalo do 3 ml fermentačného média, obsahujúceho 100 mg/l ampicilínu, v 20 x 200 mm skúmavke, a kultivovalo sa pri 37 °C 48 hodín na rotačnej trepačke. Po kultivácii bolo naakumulované množstvo kyseliny glutámovej v médiu stanovené známym spôsobom.

Zloženie fermentačného média (g/l):

glukóza	80
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>2</sub>	22
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2
NaCl	0,8
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,8
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,02
MnSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,02
Tiamín HCl	0,0002
kvasinkový extrakt	1,0
CaCO <sub>3</sub>	30,0 (suchým teplom sterilizované pri 180 °C 2 hodiny)

(glukóza a K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> sa sterilizujú oddelene)

Výsledky sú uvedené v tabuľke 2. Ako je uvedené v tabuľke 2, kmene AJ13199/pYAHN, AJ13199/pYEAS, a AJ13199/pYFIK akumulovali kyselinu glutámovú vo väčšom množstve ako kmeň AJ13199/pUC21, v ktorom nebolo zvýšené exprimované množstvo aminokyselinových vylučovacích proteínov.

Tabuľka 2

Kmeň	Kyselina glutámová, g/l
AJ13199/pUC21	21,9
AJ13199/pYAHN	27,9
AJ13199/pYEAS	29,7
AJ13199/pYFIK	28,4

#### Príklad 4

Účinok amplifikácie *yeaS*, *yeahN* a *yfiK* DNA fragmentov na produkciu lyzínu

(1) Ako lyzín produkujúca baktéria patriaca do rodu *Escherichia*, bol použitý *E. coli* kmeň W3110 (*TyrA*) (opísaný v európskej zverejnenej prihláške vynálezu č. 488424, do ktorého bol začlenený plazmid pCABD2 opísaný v medzinárodnom zverejnení č. WO 95/16042). Konkrétne boli do kmeňa *E. coli* W3110 (*TyrA*) zvedené každý z plazmidov pMV118::*yahN*, pMW118::*yeaS*, pMW118::*yfiK* a pMW118, aby sa získali nasledujúce kmene:

W3110 (*tyrA*)/pCABD2+pMW118::*yahN*

W3110 (*tyrA*)/pCABD2+pMW118::*yeaS*

W3110 (*tyrA*)/pCABD2+pMW118::*yfiK*

W3110 (*tyrA*)/pCABD2+pMW118.

Produktivita lyzínu týmito kmeňmi sa stanovila kultiváciou. Zloženie média bolo nasledovné (g/l):

glukóza	40
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>2</sub>	16,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,01
MnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,01
Tiamín HCl	0,0002
kvasinkový extrakt (Difco)	1,0

pH sa upravilo na 7,0 a médium sa autoklávovalo pri 115 °C počas 10 minút. (Glukóza a MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O sa sterilizovali oddelene)

liekopisový CaCO<sub>3</sub> 25 g/l (suchým teplom sterilizovaný pri 180 °C 2 hodiny)

Ako antibiotiká boli pridané 20 mg/l streptomycínu a 50 mg/l ampicilínu v závislosti na druhu plazmidu. Kultivácia sa uskutočňovala pri 37 °C počas 30 hodín s trepaním pri 115 otáčok/minútu. Výsledky sú uvedené v tabuľke 3.

Tabuľka 3

Kmeň	Lyzín g/l	Výťažok (%)
W3110 (tyrA)	0,08	0,2
W3110 (tyrA)/pCABD2 + pMW118	12,2	30,5
W3110 (tyrA)/pCABD2 + pMW118::yahN	13,8	34,5
W3110 (tyrA)/pCABD2 + pMW118::yeaS	12,7	31,8
W3110 (tyrA)/pCABD2 + pMW118::yfiK	12,2	30,5

Výsledok v tabuľke 3 ukazuje, že vyprodukované množstvo a výťažok na základe spotrebovaného sacharidu lyzínu je zvýšené zosilnením YahN a YeaS.

(2) Ako lyzín produkujúca baktéria, patriaca do rodu *Escherichia*, bol použitý kmeň *E. coli* VL614. Tento kmeň je odvodený od známeho *E. coli* kmeňa VL613 (SU patent č. 1354458). Na druhej strane kmeň VL613 bol získaný zo známeho kmeňa Gif102 (Theze, J. a Saint Girons. J. Bacteriol., 118, 990-998, 1974) v troch krokoch:

V prvom kroku boli vybrané mutanty rezistentné voči 2 mg/ml S-(2-aminoetyl)-L-cysteínu a medzi nimi boli nájdený kmeň VL611, ktorý je schopný produkovať L-lyzín.

V druhom kroku boli do VL611 zavedené gény zúčastňujúce sa na využívaní sacharózy a umiestnené na transpozóne Tn2555 (Doroshenko et al., Mol. Biologiya, 22, 645-658, 1988) použitím fágom P1 sprostredkovanej transdukcie, čím vznikol kmeň VL612.

V treťom kroku bola do VL612 zavedená mutácia *rhtA23* z kmeňa VKPM B-3996, ktorý dáva rezistenciu voči treonínu a homoserínu (US patent č. 5 175 107) prostredníctvom P1 fágovej transdukcie, čím vznikol kmeň VL613.

*E. coli* kmeň VL614 sa získal transdukciou divého typu alely *rhtA* génu z *E. coli* kmeňa VKPM B-6204 (MG1655 *zbi3058::Tn10*) do VL613. Transduktanty boli vyselektované na L-médiu obsahujúcom 10 mg/l tetracyklínu a medzi nimi bol nájdený kmeň VL614 (*rhtA*<sup>+</sup>) senzitivný voči 10 g/l homoserínu.

Kmeň VL614 sa transformoval pYGGA plazmidom alebo pOK12 vektorom, aby sa získali kmene VL614/pYGGA (VKPM B-7719) a VL614/pOK12 (VKPM B-7722).

Z týchto kmeňov sa každý kultivoval pri 37 °C 18 hodín v nutričnom médiu s 50 mg/l kanamycínu a 0,3 ml získanej kultúry sa inokulovalo do 3 ml fermentačného média (príklad 3), obsahujúceho 0,3 g/l treonínu, 0,3 g/l metionínu a 50 mg/l kanamycínu, v 20 x 200 mm skúmavke, a kultivovalo sa pri 37 °C 48 hodín na rotačnej trepačke. Po kultivácii bolo naakumulované množstvo lyzínu a glutamátu v médiu stanovené známym spôsobom.

Výsledky sú uvedené v tabuľke 4.

Tabuľka 4

<u>Kmeň</u>	<u>Lyzín, g/l</u>	<u>Glutamát g/l</u>
VL614/pOK12	2,6	0,8
VL614/pYGGA	3,6	2,2

Ako je ukázané v tabuľke 4, kmeň VL614/pYGGA akumuloval lyzín vo väčšom množstve ako kmeň VL614/pOK12, v ktorom nebol posilnený *yggA* gén.

Okrem toho, kmeň VL614/pYGGA akumuloval viac kyseliny glutámovej ako kmeň VL614/pOK12.

#### Príklad 5

Účinok amplifikácie *yeaS*, *yahN* a *yfiK* DNA fragmentov na produkciu treonínu, alanínu, valínu a izoleucínu

Ako treonín produkujúca baktéria patriaca do rodu *Escherichia* bol použitý *E. coli* kmeň VL2054. Tento kmeň bol odvodený od známeho *E. coli* kmeňa VKPM B-3996 (US patent č. 5 175 107) nasledovne:

Najprv bol v niekoľkých krokoch skonštruovaný nový recipientný kmeň:

Bezplazmidové deriváty kmeňa VKPM B-3996 sa vybrali po spontánnej eliminácii pVIC40 plazmidu. Alela divého typu *rhtA* génu z *E. coli* kmeňa VKPM B-6204 (MG1655 *zbi3058::Tn10*) sa zaviedla do takto získaného kmeňa, prostredníctvom P1 fágom sprostredkovanej transdukcie, rovnako ako v príklade 4.

Mutáciou inaktívovaný *kan* gén Tn5 transpozónu, začlenený do *thd* génu, sa získal po NG mutagenéze a selekcii kanamycín-senzitívnych buniek, ktoré ešte neboli schopné degradovať treonín. Tak sa získal kmeň VL2053.

Na druhej strane sa klonoval treonínový operón z pVIC40 do integračného Mud vektora pod kontrolu  $P_R$  promótoru lambda fágu. Ďalej bol do rovnakého vektora klonovaný *cat* gén z Tn9, ktorý zabezpečuje rezistenciu voči chloramfenikolu. Takto získaný konštrukt sa začlenil do chromozómu *E. coli* kmeňa C600 použitím známeho spôsobu (US patent č. 5 595 889) a transdukoval sa z takto získaného kmeňa do VL2053, čím vznikol nový, bezplazmidový kmeň VL2054, ktorý produkoval treonín. Tento kmeň akumuloval v kultivačnom médiu aj alanín, valín a izoleucín.

Kmeň VL2054 sa transformoval každým z plazmidov pYEAS, pYFIK a vektorom pUC21, aby sa získali *E. coli* kmene VL2054/pYEAS (VKPM B-7707), VL2054/pYFIK (VKPM B-7712) a VL2054/pUC21 (VKPM B-7707).

Každý z týchto kmeňov sa kultivoval pri 37 °C počas 18 hodín v nutričnom médiu so 100 mg/l ampicilínu a 0,3 ml získanej kultúry sa inokulovalo do 3 ml

fermentačného média (príklad 3), ktoré obsahovalo 100 mg/l ampicilínu, v 20 x 200 mm skúmavke, a kultivovalo sa pri 37 °C počas 48 hodín na rotačnej trepačke. Po kultivácii sa v médiu akumulované množstvá alanínu, valínu a izoleucínu určili známym spôsobom.

Výsledky sú uvedené v tabuľke 5.

Ako je uvedené v tabuľke 5, kmeň VL2054/pYFIK akumuloval treonín vo väčšom množstve ako kmeň VL2054/pUC21, v ktorom nebol zosilnený gén *yfiK*. Okrem toho kmeň VL2054/pYEAS akumuloval viac alanínu, valínu a izoleucínu ako kmeň VL2054/pUC21, v ktorom nebol zosilnený gén *yeaS*.

Tabuľka 5

Kmeň	Akumulácia aminokyseliny, g/l			
	treonín	alanín	valín	izoleucín
VL2054/pUC21	5,8	0,4	0,31	0,15
VL2054/pYEAS	5,2	1,4	0,52	0,45
VL2054/pYFIK	8,8	0,5	0,22	0,14

#### Príklad 6

Účinok amplifikácie *yeaS* a *yfiK* DNA fragmentov na produkciu histidínu

Ako histidín produkujúca baktéria patriaca do rodu *Escherichia*, bol použitý *E. coli* kmeň VL2160. Tento kmeň sa získal na základe známeho kmeňa NK5526 *hisG::Tn10* (VKPM B-3384) transdukciou *hisG<sup>R</sup>* mutácie, ktorá potláča citlivosť ATP-fosforibozyltransferázy, sprostredkovanou P1 fágom, z kmeňa CC46 (Astvatsaturianz et al., Genetika, 24, 1928-1934, 1988). Kmeň *E. coli* VL2160 sa transformoval každým z plazmidov pYEAS, pYFIK a vektorom pUC21, aby sa získali *E. coli* kmene VL2160/pYEAS (VKPM B-7753), *E. coli* VL2160/pYFIK (VKPM B-7754), *E. coli* VL2160/pUC21 (VKPM B-7752).



Každý z týchto kmeňov sa kultivoval pri 37 °C počas 18 hodín v nutričnom médiu so 100 mg/l ampicilínu a 0,3 ml získanej kultúry sa inokulovalo do 3 ml fermentačného média (príklad 3), ktoré obsahovalo zvýšené množstvo kvasinkového extraktu (3 g/l) a 100 mg/l ampicilínu, v 20 x 200 mm skúmavke, a kultivovalo sa pri 34 °C počas 68 hodín na rotačnej trepačke.

Po kultivácii sa v médiu akumulované množstvo histidínu určilo známym spôsobom. Výsledky sú uvedené v tabuľke 6.

Tabuľka 6

Kmeň	Histidín, g/l
VL2160/pUC21	1,2
VL2160/pYEAS	1,8
VL2160/pYFIK	1,4

Ako je uvedené v tabuľke 6, kmene *E. coli* VL2160/pYEAS a *E. coli* VL2160/pYFIK akumulovali histidín vo vyššom množstve ako kmeň *E. coli* VL2160/pUC21, v ktorom neboli zosilnené gény *yeaS* a *yfiK*.

#### Príklad 7

Účinok amplifikácie *yahN*, *yfiK* a *yeaS* DNA fragmentov na produkciu prolínu

Ako prolín produkujúca baktéria patriaca do rodu *Escherichia*, bol použitý kmeň VL2151 (W3350 *proB*\*  $\Delta$ *putAP* Tn10). Tento kmeň sa získal transdukciou  $\Delta$ *putAP* mutácie napojenej na Tn10 do W3350 a selekciou tetracyklín rezistentných mutantov neschopných využívať prolín ako jediný zdroj uhlíka. Takto získaný kmeň W3350  $\Delta$ *putAP* Tn10 bol mutovaný s NG a vybrali sa mutanty rezistentné voči 20 mg/l 3,4-dehydro-DL-prolínu. Medzi nimi bol nájdený VL2151 kmeň (W3350 *proB*\*  $\Delta$ *putAP* Tn10), ktorý je schopný produkovať prolín.

Kmeň *E. coli* VL2151 sa transformoval každým z plazmidov pYEAS, pYFIK, pYAHN a vektorom pUC21, aby sa získali *E. coli* kmene VL2151/pYEAS (VKPM B-7714), VL2151/pYFIK (VKPM B-7713), VL2151/pYAHN (VKPM B-7748) a *E. coli* VL2151/pUC21 (VKPM B-7715).

Každý z týchto kmeňov sa kultivoval pri 37 °C počas 18 hodín v nutričnom médiu so 100 mg/l ampicilínu a 0,3 ml získanej kultúry sa inokulovalo do 3 ml fermentačného média (príklad 3), ktoré obsahovalo 100 mg/l ampicilínu, v 20 x 200 mm skúmavke, a kultivovalo sa pri 37 °C počas 48 hodín na rotačnej trepačke. Po kultivácii sa v médiu akumulované množstvo prolínu určilo známym spôsobom. Výsledky sú uvedené v tabuľke 7.

Tabuľka 7

Kmeň	Prolín, g/l
VL2151/pUC21	1,8
VL2151/pYAHN	2,2
VL2151/pYEAS	2,1
VL2151/pYFIK	2,5

Ako je uvedené v tabuľke 7, kmene *E. coli* VL2151/pYFIK, *E. coli* VL2151/pYAHN a *E. coli* VL2151/pYEAS akumulovali prolín vo vyššom množstve ako kmeň *E. coli* VL2151/pUC21, v ktorom neboli zosilnené gény *yfiK*, *yahN* a *yeaS*. Amplifikácia génu *yfiK* mala najzreteľnejší účinok.

#### Príklad 8

##### Účinok amplifikácie *yggA* DNA fragmentov na produkciu arginínu

Ako arginín produkujúca baktéria, patriaca do rodu *Escherichia*, bol použitý kmeň W3350 *argE::Tn10/pKA10*. Tento kmeň obsahuje plazmid pKA10, ktorý obsahuje DNA oblasť z *Corynebacterium (Brevibacterium) flavum*, ktorá je

komplementárna aspoň s *argA* a *argE* mutáciami v recipientom kmeni *E. coli* K-12 (Kharitonov A. a Tarasov A.P. Molecular Genetics, Microbiology and Virology. č. 9, 29-33, 1986).

Kmeň *E. coli* W3350 *argE*::Tn10/pKA10 sa transformoval plazmidom pYGGA alebo vektorom pOK12, aby sa získali kmene *E. coli* W3350 *argE*::Tn10/pKA10, pYGGA (VKPM B-7716) a *E. coli* W3350 *argE*::Tn10/pKA10, pOK12 (VKPM B-7718).

Každý z takto získaných kmeňov sa kultivoval pri 37 °C počas 18 hodín v nutričnom médiu so 100 mg/l ampicilínu a 50 mg/l kanamycínu, a 0,3 ml získanej kultúry sa inokulovalo do 3 ml fermentačného média (príklad 3), ktoré obsahovalo 100 mg/l ampicilínu a 50 mg/l kanamycínu, v 20 x 200 mm skúmavke, a kultivovalo sa pri 37 °C počas 48 hodín na rotačnej trepačke. Po kultivácii sa v médiu akumulované množstvo arginínu určilo známym spôsobom.

Výsledky sú uvedené v tabuľke 8.

Tabuľka 8

Kmeň	Arginín, g/l
W3350 <i>argE</i> ::Tn10/pKA10, pOK12	0,11
W3350 <i>argE</i> ::Tn10/pKA10, pYGGA	0,46

Ako je uvedené v tabuľke 8, kmeň *E. coli* W3350 *argE*::Tn10/pKA10, pYGGA akumuloval arginín vo vyššom množstve ako kmeň *E. coli* W3350 *argE*::Tn10/pKA10, pOK12, v ktorom nebol zosilnený gén *yggA*.

Nasledujúce kmene *E. coli* boli uložené (v súlade s medzinárodným deponovaním na základe budapeštianskej dohody) v Ruskej národnej zbierke priemyselných mikroorganizmov (VKPM), 29. decembra, 1998, pod prístupovými číslami uvedenými v zátvorkách.

AJ13199/pUC21 (VKPM B-7728)

AJ13199/pYAHN (VKPM B-7729)

AJ13199/pYEAS (VKPM B-7731)

AJ13199/pYFIK (VKPM B-7730)

VL614/pYGGGA (VKPM B-7719)

VL614/pOK12 (VKPM B-7722)

VL2054/pYEAS (VKPM B-7707)

VL2054/pYFIK (VKPM B-7712)

VL2054/pUC21 (VKPM B-7708)

VL2160/pYEAS (VKPM B-7753)

VL2160/pYFIK (VKPM B-7754)

VL2160/pUC21 (VKPM B-7752)

VL2151/pYFIK (VKPM B-7713)

VL2151/pYEAS (VKPM B-7714)

VL2151/pYAHN (VKPM B-7748)

VL2151/pUC21 (VKPM B-7715)

W3350 *argE*::Tn10/pKA10, pYGGGA (VKPM B-7716)

W3350 *argE*::Tn10/pKA10, pOK12 (VKPM B-7718)

Zoznam sekvencií

- <110> Livshits, Vitaliy Arkadievich  
Zakataeva, Natalia Pavlovna  
Nakanishi, Kazuo  
Aleshin, Vladimir Veniaminovich  
Troshin, Petr Vladimirovich  
Tokhmakova, Irina Lyvovna
- <120> Spôsob výroby L-aminokyseliny
- <130>
- <160> 24
- <210> 1
- <211> 27
- <212> DNA
- <213> Syntetická sekvencia
- <220>
- <223> Opis syntetickej sekvencie: primer na amplifikáciu *Escherichia coli* yahN génu
- 
- <400> 1
- ggcgagctcc cagtaaccgg aaataag 27
- 
- <210> 2
- <211> 27
- <212> DNA
- <213> Syntetická sekvencia
- <220>
- <223> Opis syntetickej sekvencie: primer na amplifikáciu *Escherichia coli* yahN génu

<400> 2

cgctctagaa aggaccacgc attacgg

27

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Syntetická sekvencia

<220>

<223> Opis syntetickej sekvencie: primer na amplifikáciu *Escherichia coli* yeaS génu

<400> 3

ggcgagctca gattggttag catattc

27

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Syntetická sekvencia

<220>

<223> Opis syntetickej sekvencie: primer na amplifikáciu *Escherichia coli* yeaS génu

<400> 4

cggtctagaa tcagcgaaga atcaggg

27

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Syntetická sekvencia

<220>

<223> Opis syntetickej sekvencie: primer na amplifikáciu *Escherichia coli* yfiK génu

<400> 5

ggcgagctca tgttccgtgt cgggtac

27

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Syntetická sekvencia

<220>

<223> Opis syntetickej sekvencie: primer na amplifikáciu *Escherichia coli* yfiK génu

<400> 6

ggctctagat agcaagttac taagcgg

27

<210> 7

<211> 35

<212> DNA

<213> Syntetická sekvencia

<220>

<223> Opis syntetickej sekvencie: primer na amplifikáciu *Escherichia coli* yggA génu

<400> 7

ctctgaattc tctcttatta gttttctga ttgcc

35

<210> 8

<211> 38

<212> DNA

<213> Syntetická sekvencia

<220>

<223> Opis syntetickej sekvencie: primer na amplifikáciu *Escherichia coli* yggA génu

<400> 8

cgtgacctgc agcgttctca cagcgcggta gcctttaa

38

<210> 9

<211> 672

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(672)

<400> 9

atg atg cag tta gtt cac tta ttt atg gat gaa atc act atg gat cct	48
Met Met Gln Leu Val His Leu Phe Met Asp Glu Ile Thr Met Asp Pro	
1 5 10 15	
ttg cat gcc gtt tac ctg acc gta gga ctg ttc gtg att act ttt ttt	96
Leu His Ala Val Tyr Leu Thr Val Gly Leu Phe Val Ile Thr Phe Phe	
20 25 30	
aat ccg gga gcc aat ctc ttt gtg gta gta caa acc agc ctg gct tcc	144
Asn Pro Gly Ala Asn Leu Phe Val Val Val Gln Thr Ser Leu Ala Ser	
35 40 45	
ggt cga cgc gca ggg gtg ctg acc ggg ctg ggc gtg gcg ctg ggc gat	192
Gly Arg Arg Ala Gly Val Leu Thr Gly Leu Gly Val Ala Leu Gly Asp	
50 55 60	
gca ttt tat tcc ggg ttg ggt ttg ttt ggt ctt gca acg cta att acg	240
Ala Phe Tyr Ser Gly Leu Gly Leu Phe Gly Leu Ala Thr Leu Ile Thr	
65 70 75 80	
cag tgt gag gag att ttt tcg ctt atc aga atc gtc ggc ggc gct tat	288
Gln Cys Glu Glu Ile Phe Ser Leu Ile Arg Ile Val Gly Gly Ala Tyr	
85 90 95	
ctc tta tgg ttt gcg tgg tgc agc atg cgc cgc cag tca aca ccg caa	336
Leu Leu Trp Phe Ala Trp Cys Ser Met Arg Arg Gln Ser Thr Pro Gln	
100 105 110	
atg agc aca cta caa caa ccg att agc gcc ccc tgg tat gtc ttt ttt	384
Met Ser Thr Leu Gln Gln Pro Ile Ser Ala Pro Trp Tyr Val Phe Phe	
115 120 125	



cgc cgc gga tta att acc gat ctc tct aac ccg caa acc gtt tta ttt 432  
Arg Arg Gly Leu Ile Thr Asp Leu Ser Asn Pro Gln Thr Val Leu Phe  
130 135 140  
ttt atc agt att ttc tca gta aca tta aat gcc gaa aca cca aca tgg 480  
Phe Ile Ser Ile Phe Ser Val Thr Leu Asn Ala Glu Thr Pro Thr Trp  
145 150 155 160  
gca cgt tta atg gcc tgg gcg ggg att gtg ctc gca tca att atc tgg 528  
Ala Arg Leu Met Ala Trp Ala Gly Ile Val Leu Ala Ser Ile Ile Trp  
165 170 175  
cga gtt ttt ctt agt cag gcg ttt tct ttg ccc gct gtg cgt cgt gct 576  
Arg Val Phe Leu Ser Gln Ala Phe Ser Leu Pro Ala Val Arg Arg Ala  
180 185 190  
tat ggg cgt atg caa cgc gtt gcc agt cgg gtt att ggt gca att att 624  
Tyr Gly Arg Met Gln Arg Val Ala Ser Arg Val Ile Gly Ala Ile Ile  
195 200 205  
ggg gta ttc gcg cta cgc ctg att tac gaa ggg gtg acg cag cgg tga 672  
Gly Val Phe Ala Leu Arg Leu Ile Tyr Glu Gly Val Thr Gln Arg  
210 215 220

<210> 10

<211> 223

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 10

Met Met Gln Leu Val His Leu Phe Met Asp Glu Ile Thr Met Asp Pro  
1 5 10 15  
Leu His Ala Val Tyr Leu Thr Val Gly Leu Phe Val Ile Thr Phe Phe  
20 25 30  
Asn Pro Gly Ala Asn Leu Phe Val Val Val Gln Thr Ser Leu Ala Ser  
35 40 45  
Gly Arg Arg Ala Gly Val Leu Thr Gly Leu Gly Val Ala Leu Gly Asp  
50 55 60  
Ala Phe Tyr Ser Gly Leu Gly Leu Phe Gly Leu Ala Thr Leu Ile Thr  
65 70 75 80  
Gln Cys Glu Glu Ile Phe Ser Leu Ile Arg Ile Val Gly Gly Ala Tyr  
85 90 95

Leu Leu Trp Phe Ala Trp Cys Ser Met Arg Arg Gln Ser Thr Pro Gln  
100 105 110  
Met Ser Thr Leu Gln Gln Pro Ile Ser Ala Pro Trp Tyr Val Phe Phe  
115 120 125  
Arg Arg Gly Leu Ile Thr Asp Leu Ser Asn Pro Gln Thr Val Leu Phe  
130 135 140  
Phe Ile Ser Ile Phe Ser Val Thr Leu Asn Ala Glu Thr Pro Thr Trp  
145 150 155 160  
Ala Arg Leu Met Ala Trp Ala Gly Ile Val Leu Ala Ser Ile Ile Trp  
165 170 175  
Arg Val Phe Leu S,r Gln Ala Phe Ser Leu Pro Ala Val Arg Arg Ala  
180 185 190  
Tyr Gly Arg Met Gln Arg Val Ala Ser Arg Val Ile Gly Ala Ile Ile  
195 200 205  
Gly Val Phe Ala Leu Arg Leu Ile Tyr Glu Gly Val Thr Gln Arg  
210 215 220

<210> 11

<211> 639

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(639)

<400> 11

gtg ttc gct gaa tac ggg gtt ctg aat tac tgg acc tat ctg gtt ggg 48  
Met Phe Ala Glu Tyr Gly Val Leu Asn Tyr Trp Thr Tyr Leu Val Gly  
1 5 10 15  
gcc att ttt att gtg ttg gtg cca ggg cca aat acc ctg ttt gta ctc 96  
Ala Ile Phe Ile Val Leu Val Pro Gly Pro Asn Thr Leu Phe Val Leu  
20 25 30  
aaa aat agc gtc agt agc ggt atg aaa ggc ggt tat ctt gcg gcc tgc 144  
Lys Asn Ser Val Ser Ser Gly Met Lys Gly Gly Tyr Leu Ala Ala Cys  
35 40 45

ggt gta ttt att ggc gat gcg gta ttg atg ttt ctg gca tgg gct gga 192  
Gly Val Phe Ile Gly Asp Ala Val Leu Met Phe Leu Ala Trp Ala Gly  
50 55 60

gtg gcg aca tta att aag acc acc ccg ata tta ttc aac att gta cgt 240  
Val Ala Thr Leu Ile Lys Thr Thr Pro Ile Leu Phe Asn Ile Val Arg  
65 70 75 80

tat ctt ggt gcg ttt tat ttg ctc tat ctg ggg agt aaa att ctt tac 288  
Tyr Leu Gly Ala Phe Tyr Leu Leu Tyr Leu Gly Ser Lys Ile Leu Tyr  
85 90 95

gcg acc ctg aag ggt aaa aat agc gag gcc aaa tcc gat gag ccc caa 336  
Ala Thr Leu Lys Gly Lys Asn Ser Glu Ala Lys Ser Asp Glu Pro Gln  
100 105 110

tac ggt gct att ttt aaa cgc gcg tta att ttg agc ctg act aat ccg 384  
Tyr Gly Ala Ile Phe Lys Arg Ala Leu Ile Leu Ser Leu Thr Asn Pro  
115 120 125

aaa gcc att ttg ttc tat gtg tcg ttt ttc gta cag ttt atc gat gtt 432  
Lys Ala Ile Leu Phe Tyr Val Ser Phe Phe Val Gln Phe Ile Asp Val  
130 135 140

aat gcc cca cat acg gga att tca ttc ttt att ctg gcg gcg acg ctg 480  
Asn Ala Pro His Thr Gly Ile Ser Phe Phe Ile Leu Ala Ala Thr Leu  
145 150 155 160

gaa ctg gtg agt ttc tgc tat ttg agc ttc ctg att ata tct ggt gct 528  
Glu Leu Val Ser Phe Cys Tyr Leu Ser Phe Leu Ile Ile Ser Gly Ala  
165 170 175

ttt gtc acg cag tac ata cgt acc aaa aag aaa ctg gct aaa gtt ggc 576  
Phe Val Thr Gln Tyr Ile Arg Thr Lys Lys Lys Leu Ala Lys Val Gly  
180 185 190

aac tca ctg att ggt ttg atg ttc gtg ggt ttc gct gcc cga ctg gcg 624  
Asn Ser Leu Ile Gly Leu Met Phe Val Gly Phe Ala Ala Arg Leu Ala  
195 200 205

acg ctg caa tcc tga 639  
Thr Leu Gln Ser  
210

<210> 12

<211> 212

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 12

Met Phe Ala Glu Tyr Gly Val Leu Asn Tyr Trp Thr Tyr Leu Val Gly  
1                   5                   10                   15  
Ala Ile Phe Ile Val Leu Val Pro Gly Pro Asn Thr Leu Phe Val Leu  
                  20                   25                   30  
Lys Asn Ser Val Ser Ser Gly Met Lys Gly Gly Tyr Leu Ala Ala Cys  
          35                   40                   45  
Gly Val Phe Ile Gly Asp Ala Val Leu Met Phe Leu Ala Trp Ala Gly  
          50                   55                   60  
Val Ala Thr Leu Ile Lys Thr Thr Pro Ile Leu Phe Asn Ile Val Arg  
65                   70                   75                   80  
Tyr Leu Gly Ala Phe Tyr Leu Leu Tyr Leu Gly Ser Lys Ile Leu Tyr  
                  85                   90                   95  
Ala Thr Leu Lys Gly Lys Asn Ser Glu Ala Lys Ser Asp Glu Pro Gln  
                  100                   105                   110  
Tyr Gly Ala Ile Phe Lys Arg Ala Leu Ile Leu Ser Leu Thr Asn Pro  
                  115                   120                   125  
Lys Ala Ile Leu Phe Tyr Val Ser Phe Phe Val Gln Phe Ile Asp Val  
                  130                   135                   140  
Asn Ala Pro His Thr Gly Ile Ser Phe Phe Ile Leu Ala Ala Thr Leu  
145                   150                   155                   160  
Glu Leu Val Ser Phe Cys Tyr Leu Ser Phe Leu Ile Ile Ser Gly Ala  
                  165                   170                   175  
Phe Val Thr Gln Tyr Ile Arg Thr Lys Lys Lys Leu Ala Lys Val Gly  
                  180                   185                   190  
Asn Ser Leu Ile Gly Leu Met Phe Val Gly Phe Ala Ala Arg Leu Ala  
                  195                   200                   205  
Thr Leu Gln Ser  
                  210

<210> 13

<211> 588

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(588)

<400> 13

gtg aca ccg acc ctt tta agt gct ttt tgg act tac acc ctg att acc 48  
Met Thr Pro Thr Leu Leu Ser Ala Phe Trp Thr Tyr Thr Leu Ile Thr  
1 5 10 15  
gct atg acg cca gga ccg aac aat att ctc gcc ctt agc tct gct acg 96  
Ala Met Thr Pro Gly Pro Asn Asn Ile Leu Ala Leu Ser Ser Ala Thr  
20 25 30  
tcg cat gga ttt cgt caa agt acc cgc gtg ctg gca ggg atg agt ctg 144  
Ser His Gly Phe Arg Gln Ser Thr Arg Val Leu Ala Gly Met Ser Leu  
35 40 45  
gga ttt ttg att gtg atg tta ctg tgt gcg ggc att tca ttt tca ctg 192  
Gly Phe Leu Ile Val Met Leu Leu Cys Ala Gly Ile Ser Phe Ser Leu  
50 55 60  
gca gtg att gac ccg gca gcg gta cac ctt ttg agt tgg gcg ggg gcg 240  
Ala Val Ile Asp Pro Ala Ala Val His Leu Leu Ser Trp Ala Gly Ala  
65 70 75 80  
gca tat att gtc tgg ctg gcg tgg aaa atc gcc acc agc cca aca aag 288  
Ala Tyr Ile Val Trp Leu Ala Trp Lys Ile Ala Thr Ser Pro Thr Lys  
85 90 95  
gaa gac gga ctt cag gca aaa cca atc agc ttt tgg gcc agc ttt gct 336  
Glu Asp Gly Leu Gln Ala Lys Pro Ile Ser Phe Trp Ala Ser Phe Ala  
100 105 110  
ttg cag ttt gtg aac gtc aaa atc att ttg tac ggt gtt acg gca ctg 384  
Leu Gln Phe Val Asn Val Lys Ile Ile Leu Tyr Gly Val Thr Ala Leu  
115 120 125  
tcg acg ttt gtt ctg ccg caa aca cag gcg tta agc tgg gta gtt ggc 432  
Ser Thr Phe Val Leu Pro Gln Thr Gln Ala Leu Ser Trp Val Val Gly  
130 135 140  
gtc agc gtt ttg ctg gcg atg att ggg acg ttt ggc aat gtg tgc tgg 480  
Val Ser Val Leu Leu Ala Met Ile Gly Thr Phe Gly Asn Val Cys Trp  
145 150 155 160  
gcg ctg gcg ggg cat ctg ttt cag cga ttg ttt cgc cag tat ggt cgc 528  
Ala Leu Ala Gly His Leu Phe Gln Arg Leu Phe Arg Gln Tyr Gly Arg  
165 170 175  
cag tta aat atc gtg ctt gcc ctg ttg ctg gtc tat tgc gcg gta cgc 576  
Gln Leu Asn Ile Val Leu Ala Leu Leu Leu Val Tyr Cys Ala Val Arg  
180 185 190  
att ttc tat taa 588  
Ile Phe Tyr  
195

<210> 14

<211> 195

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 14

Met Thr Pro Thr Leu Leu Ser Ala Phe Trp Thr Tyr Thr Leu Ile Thr  
1 5 10 15  
Ala Met Thr Pro Gly Pro Asn Asn Ile Leu Ala Leu Ser Ser Ala Thr  
20 25 30  
Ser His Gly Phe Arg Gln Ser Thr Arg Val Leu Ala Gly Met Ser Leu  
35 40 45  
Gly Phe Leu Ile Val Met Leu Leu Cys Ala Gly Ile Ser Phe Ser Leu  
50 55 60  
Ala Val Ile Asp Pro Ala Ala Val His Leu Leu Ser Trp Ala Gly Ala  
65 70 75 80  
Ala Tyr Ile Val Trp Leu Ala Trp Lys Ile Ala Thr Ser Pro Thr Lys  
85 90 95  
Glu Asp Gly Leu Gln Ala Lys Pro Ile Ser Phe Trp Ala Ser Phe Ala  
100 105 110  
Leu Gln Phe Val Asn Val Lys Ile Ile Leu Tyr Gly Val Thr Ala Leu  
115 120 125  
Ser Thr Phe Val Leu Pro Gln Thr Gln Ala Leu Ser Trp Val Val Gly  
130 135 140  
Val Ser Val Leu Leu Ala Met Ile Gly Thr Phe Gly Asn Val Cys Trp  
145 150 155 160  
Ala Leu Ala Gly His Leu Phe Gln Arg Leu Phe Arg Gln Tyr Gly Arg  
165 170 175  
Gln Leu Asn Ile Val Leu Ala Leu Leu Leu Val Tyr Cys Ala Val Arg  
180 185 190  
Ile Phe Tyr  
195

<210> 15

<211> 636

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(636)

<400> 15

```
gtg ttt tct tat tac ttt caa ggt ctt gca ctt ggg gcg gct atg atc 48
Met Phe Ser Tyr Tyr Phe Gln Gly Leu Ala Leu Gly Ala Ala Met Ile
  1           5           10           15
cta ccg ctc ggt cca caa aat gct ttt gtg atg aat cag ggc ata cgt 96
Leu Pro Leu Gly Pro Gln Asn Ala Phe Val Met Asn Gln Gly Ile Arg
           20           25           30
cgt cag tac cac att atg att gcc tta ctt tgt gct atc agc gat ttg 144
Arg Gln Tyr His Ile Met Ile Ala Leu Leu Cys Ala Ile Ser Asp Leu
           35           40           45
gtc ctg att tgc gcc ggg att ttt ggt ggc agc gcg tta ttg atg cag 192
Val Leu Ile Cys Ala Gly Ile Phe Gly Gly Ser Ala Leu Leu Met Gln
           50           55           60
tcg ccg tgg ttg ctg gcg ctg gtc acc tgg ggc ggc gta gcc ttc ttg 240
Ser Pro Trp Leu Leu Ala Leu Val Thr Trp Gly Gly Val Ala Phe Leu
           65           70           75           80
ctg tgg tat ggt ttt ggc gct ttt aaa aca gca atg agc agt aat att 288
Leu Trp Tyr Gly Phe Gly Ala Phe Lys Thr Ala Met Ser Ser Asn Ile
           85           90           95
gag tta gcc agc gcc gaa gtc atg aag caa ggc aga tgg aaa att atc 336
Glu Leu Ala Ser Ala Glu Val Met Lys Gln Gly Arg Trp Lys Ile Ile
           100           105           110
gcc acc atg ttg gca gtg acc tgg ctg aat ccg cat gtt tac ctg gat 384
Ala Thr Met Leu Ala Val Thr Trp Leu Asn Pro His Val Tyr Leu Asp
           115           120           125
act ttt gtt gta ctg ggc agc ctt ggc ggg caa ctt gat gtg gaa cca 432
Thr Phe Val Val Leu Gly Ser Leu Gly Gly Gln Leu Asp Val Glu Pro
           130           135           140
aaa cgc tgg ttt gca ctc ggg aca att agc gcc tct ttc ctg tgg ttc 480
Lys Arg Trp Phe Ala Leu Gly Thr Ile Ser Ala Ser Phe Leu Trp Phe
           145           150           155           160
ttt ggt ctg gct ctt ctc gca gcc tgg ctg gca ccg cgt ctg cgc acg 528
Phe Gly Leu Ala Leu Leu Ala Ala Trp Leu Ala Pro Arg Leu Arg Thr
           165           170           175
```

gca aaa gca cag cgc att atc aat ctg gtt gtg gga tgt gtt atg tgg 576  
Ala Lys Ala Gln Arg Ile Ile Asn Leu Val Val Gly Cys Val Met Trp  
180 185 190  
ttt att gcc ttg cag ctg gcg aga gac ggt att gct cat gca caa gcc 624  
Phe Ile Ala Leu Gln Leu Ala Arg Asp Gly Ile Ala His Ala Gln Ala  
195 200 205  
ttg ttc agt tag 636  
Leu Phe Ser  
210

<210> 16

<211> 211

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 16

Met Phe Ser Tyr Tyr Phe Gln Gly Leu Ala Leu Gly Ala Ala Met Ile  
1 5 10 15  
Leu Pro Leu Gly Pro Gln Asn Ala Phe Val Met Asn Gln Gly Ile Arg  
20 25 30  
Arg Gln Tyr His Ile Met Ile Ala Leu Leu Cys Ala Ile Ser Asp Leu  
35 40 45  
Val Leu Ile Cys Ala Gly Ile Phe Gly Gly Ser Ala Leu Leu Met Gln  
50 55 60  
Ser Pro Trp Leu Leu Ala Leu Val Thr Trp Gly Gly Val Ala Phe Leu  
65 70 75 80  
Leu Trp Tyr Gly Phe Gly Ala Phe Lys Thr Ala Met Ser Ser Asn Ile  
85 90 95  
Glu Leu Ala Ser Ala Glu Val Met Lys Gln Gly Arg Trp Lys Ile Ile  
100 105 110  
Ala Thr Met Leu Ala Val Thr Trp Leu Asn Pro His Val Tyr Leu Asp  
115 120 125  
Thr Phe Val Val Leu Gly Ser Leu Gly Gly Gln Leu Asp Val Glu Pro  
130 135 140  
Lys Arg Trp Phe Ala Leu Gly Thr Ile Ser Ala Ser Phe Leu Trp Phe  
145 150 155 160  
Phe Gly Leu Ala Leu Leu Ala Ala Trp Leu Ala Pro Arg Leu Arg Thr  
165 170 175



Ala Lys Ala Gln Arg Ile Ile Asn Leu Val Val Gly Cys Val Met Trp  
          180                                  185                                  190  
Phe Ile Ala Leu Gln Leu Ala Arg Asp Gly Ile Ala His Ala Gln Ala  
          195                                  200                                  205  
Leu Phe Ser  
          210

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Syntetická sekvencia

<220>

<223> Opis syntetickej sekvencie: primer na amplifikáciu *Escherichia coli* yahN  
génu

<400> 17

gtgtggaacc gacgccggat 20

<210> 18

<211> 23

<212> DNA

<213> Syntetická sekvencia

<220>

<223> Opis syntetickej sekvencie: primer na amplifikáciu *Escherichia coli* yahN  
génu

<400> 18

tgttgtatgg tacgggggttc gag 23

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Syntetická sekvencia

<220>

<223> Opis syntetickej sekvencie: primer na amplifikáciu *Escherichia coli* yeaS génu

<400> 19

cttgccaat cccgtctccc

20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Syntetická sekvencia

<220>

<223> Opis syntetickej sekvencie: primer na amplifikáciu *Escherichia coli* yeaS génu

<400> 20

gccccatgca taacggaaag

20

<210> 21

<211> 26

<212> DNA

<213> Syntetická sekvencia

<220>

<223> Opis syntetickej sekvencie: primer na amplifikáciu *Escherichia coli* yfiK génu

<400> 21

gaagatcttg taggccggat aaggcg

26

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Syntetická sekvencia

<220>

<223> Opis syntetickej sekvencie: primer na amplifikáciu *Escherichia coli* yfiK génu

<400> 22

tggtttacc aattggccgc

20

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> Syntetická sekvencia

<220>

<223> Opis syntetickej sekvencie: primer na amplifikáciu *Escherichia coli* yggA génu

<400> 23

acttctcccg cgagccagtt c

21

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Syntetická sekvencia

<220>

<223> Opis syntetickej sekvencie: primer na amplifikáciu *Escherichia coli* yggA génu

<400> 24

ggcaagctta ggcctctgt t

21

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Baktéria patriaca do rodu *Escherichia*, ktorá má schopnosť produkovať L-aminokyselinu, pričom schopnosť produkovať L-aminokyselinu je zvýšená prostredníctvom zvýšenia exprimovaného množstva najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny, ktorá pozostáva z nasledujúcich proteínov (A) až (H):

(A) proteín, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu uvedenú v Zozname sekvencií ako sekv. č.: 10;

(B) proteín, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu, vrátane delécie, substitúcie, inzercie, pridania alebo inverzie jednej alebo niekoľkých aminokyselín, v aminokyselinovej sekvencii uvedenej v Zozname sekvencií ako sekv. č.:10, a ktorý zabezpečuje, že baktéria, ktorá ho obsahuje, má zvýšenú schopnosť produkovať L-aminokyselinu;

(C) proteín, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu uvedenú v Zozname sekvencií ako sekv. č.: 12;

(D) proteín, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu, vrátane delécie, substitúcie, inzercie, pridania alebo inverzie jednej alebo niekoľkých aminokyselín, v aminokyselinovej sekvencii uvedenej v Zozname sekvencií ako sekv. č.:12, a ktorý zabezpečuje, že baktéria, ktorá ho obsahuje, má zvýšenú schopnosť produkovať L-aminokyselinu;

(E) proteín, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu uvedenú v Zozname sekvencií ako sekv. č.: 14;

(F) proteín, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu, vrátane delécie, substitúcie, inzercie, pridania alebo inverzie jednej alebo niekoľkých aminokyselín, v aminokyselinovej sekvencii uvedenej v Zozname sekvencií ako sekv. č.:14, a ktorý zabezpečuje, že baktéria, ktorá ho obsahuje, má zvýšenú schopnosť produkovať L-aminokyselinu;

(G) proteín, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu uvedenú v Zozname sekvencií ako sekv. č.: 16; alebo

(H) proteín, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu, vrátane delécie, substitúcie, inzercie, pridania alebo inverzie jednej alebo niekoľkých aminokyselín, v amino-

kyselinovej sekvencii uvedenej v Zozname sekvencií ako sekv. č.:16, a ktorý zabezpečuje, že baktéria, ktorá ho obsahuje, má zvýšenú schopnosť produkovať L-aminokyselinu.

2. Baktéria podľa nároku 1, kde L-aminokyselinou je L-lyzín a je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (A) až (D), (G) a (H).

3. Baktéria podľa nároku 1, kde L-aminokyselinou je kyselina L-glutámová a je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (A) až (H).

4. Baktéria podľa nároku 1, kde L-aminokyselinou je L-alanín a je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (C) a (D).

5. Baktéria podľa nároku 1, kde L-aminokyselinou je L-valín a je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (C) a (D).

6. Baktéria podľa nároku 1, kde L-aminokyselinou je L-histidín a je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (C) až (F).

7. Baktéria podľa nároku 1, kde L-aminokyselinou je L-prolín a je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (A) až (F).

8. Baktéria podľa nároku 1, kde L-aminokyselinou je L-treonín a je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (E) a (F).

9. Baktéria podľa nároku 1, kde L-aminokyselinou je L-arginín a je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (G) a (H).

10. Baktéria podľa nároku 1, kde L-aminokyselinou je L-izoleucín a je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (C) a (D).

11. Baktéria podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 10, kde v bunke je zvýšený počet kópií DNA kódujúcej uvedený proteín.

12. Baktéria podľa nároku 11, kde v bunke je DNA nesená na multikópiovom vektore.

13. Baktéria podľa nároku 11, kde v bunke je DNA nesená na transpozóne.

14. Spôsob produkcie L-aminokyseliny, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa nasledujúce kroky:

- kultiváciu baktérie podľa nároku 1 v kultivačnom médiu na produkciu a akumuláciu L-aminokyseliny v médiu, a
- izolovanie L-aminokyseliny z média.

15. Spôsob podľa nároku 14, vyznačujúci sa tým, že L-aminokyselinou je L-lyzín a v baktérii je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (A) až (D), (G) a (H).

16. Spôsob podľa nároku 14, vyznačujúci sa tým, že L-aminokyselinou je kyselina L-glutámová a v baktérii je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (A) až (H).

17. Spôsob podľa nároku 14, vyznačujúci sa tým, že L-amino-kyselinou je L-alanín a v baktérii je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (C) a (D).

18. Spôsob podľa nároku 14, vyznačujúci sa tým, že L-amino-kyselinou je L-valín a v baktérii je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (C) a (D).

19. Spôsob podľa nároku 14, vyznačujúci sa tým, že L-amino-kyselinou je L-histidín a v baktérii je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (C) až (F).

20. Spôsob podľa nároku 14, vyznačujúci sa tým, že L-amino-kyselinou je L-prolín a v baktérii je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (A) až (F).

21. Spôsob podľa nároku 14, vyznačujúci sa tým, že L-amino-kyselinou je L-treonín a v baktérii je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (E) a (F).

22. Spôsob podľa nároku 14, vyznačujúci sa tým, že L-amino-kyselinou je L-arginín a v baktérii je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (G) a (H).

23. Spôsob podľa nároku 14, vyznačujúci sa tým, že L-amino-kyselinou je L-izoleucín a v baktérii je zvýšené exprimované množstvo najmenej jedného proteínu vybraného zo skupiny pozostávajúcej z proteínov (C) a (D).

24. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 14 až 23, vyznačujúci sa tým, že v bunke baktérie je zvýšený počet kópií DNA kódujúcej uvedený proteín.

25. Spôsob podľa nároku 24, vyznačujúci sa tým, že v bunke je DNA nesená na multikópiovom vektore.

26. Spôsob podľa nároku 24, vyznačujúci sa tým, že v bunke je DNA nesená na transpozóne.