



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103459412 B

(45)授权公告日 2020.08.18

(21)申请号 201280016388.3

(22)申请日 2012.03.27

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103459412 A

(43)申请公布日 2013.12.18

(30)优先权数据

102011006716.7 2011.04.04 DE

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.09.29

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/055359 2012.03.27

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/136506 DE 2012.10.11

(73)专利权人 赢创运营有限公司

地址 德国埃森

(72)发明人 S·汉斯 B·巴特 A·雷特

W·克莱斯 R·克雷默

G·赛博尔德 A·亨里希

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

代理人 于辉

(51)Int.Cl.

C07K 14/34(2006.01)

C12P 13/08(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

(56)对比文件

EP 2107128 A2,2009.10.07

WO 0226989 A1,2002.04.04

CN 1578834 A,2005.02.09

WO 2009128644 A2,2009.10.22

Henrich A.W..Characterization of
Maltose and Trehalose Transport in
Corynebacterium glutamicum.

《Dissertation》.2011,

审查员 陈莹

权利要求书1页 说明书23页

序列表36页 附图2页

(54)发明名称

发酵制备有机化合物的微生物和方法

(57)摘要

本发明涉及产生和/或分泌有机化合物的微生物,其中所述微生物与特定的起始菌株相比,其中具有海藻糖输入蛋白活性的ABC转运蛋白的一或多个蛋白质亚基表达增加,所述微生物能从培养基中摄取海藻糖;本发明还涉及使用本发明的微生物制备有机化合物的方法,其中海藻糖在发酵液中的积累被降低或避免。

1. 产生和/或分泌有机化合物的谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 微生物, 特征在于所述微生物与特定的起始菌株相比, 其中编码由SEQ ID NO:8或10所示的氨基酸序列组成的多肽的多核苷酸的表达增加, 所述多肽是通透酶, 其是具有海藻糖输入蛋白活性的蛋白质复合物的亚基, 所述微生物能从培养基中摄取海藻糖, 并且所述有机化合物是蛋白质L-氨基酸。

2. 权利要求1的微生物, 特征在于所述蛋白质L-氨基酸选自L-赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-缬氨酸、L-脯氨酸、L-谷氨酸和L-异亮氨酸。

3. 权利要求1的微生物, 特征在于所述蛋白质L-氨基酸是L-赖氨酸。

4. 权利要求1-3任一项的微生物, 特征在于通过选自如下一组的一或多项措施使编码具有海藻糖输入蛋白活性的ABC转运蛋白的蛋白质亚基的多核苷酸的表达增加:

a) 所述基因的表达在启动子控制下, 所述启动子与所述基因的原始启动子相比在用于所述方法的微生物中的作用强;

b) 增加编码具有海藻糖输入蛋白活性的多肽的基因的拷贝数;

c) 使用核糖体结合位点表达所述基因, 所述核糖体结合位点与所述基因的原始核糖体结合位点相比在用于所述方法的微生物中作用强;

d) 所述基因的表达通过优化用于所述方法的微生物的密码子选择而实现;

e) 所述基因的表达通过降低由所述基因转录的mRNA中的mRNA二级结构而实现;

f) 所述基因的表达通过消除由所述基因转录的mRNA中的RNA聚合酶终止子序列而实现;

g) 所述基因的表达通过在由所述基因转录的mRNA中使用mRNA稳定化序列而实现。

5. 权利要求4的微生物, 特征在于在措施b) 中, 通过将所述基因以增加的拷贝数插入质粒中和/或通过所述基因的至少一个拷贝整合进所述微生物的染色体中而增加所述基因拷贝数。

6. 发酵制备有机化合物的方法, 包括如下步骤:

a) 将权利要求1-5任一项的微生物在合适的培养基中培养, 获得发酵液, 及

b) 积累在步骤a) 的发酵液中的有机化合物。

7. 权利要求6的方法, 特征在于海藻糖在发酵液中的积累被降低或消除。

发酵制备有机化合物的微生物和方法

[0001] 本发明涉及产生和/或分泌有机化合物的微生物,所述微生物的海藻糖输入蛋白(importer)表达增加,本发明还涉及使用本发明的微生物制备有机化合物的方法。

现有技术

[0002] L-氨基酸用于人用药物、制药工业、食品工业,特别用于动物营养。

[0003] 已知L-氨基酸如L-赖氨酸是通过棒杆菌、特别是谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)菌株或者肠杆菌科菌株、特别是大肠杆菌(*Escherichia coli*)的发酵产生的。由于巨大的经济重要性,持续进行着关于改良生产方法的工作。方法的改良涉及发酵技术措施如搅拌和供氧,或者涉及营养培养基的组成成分,例如发酵期间的糖浓度,或者涉及产物形式的加工,例如离子交换层析,或者涉及微生物自身的固有性质。

[0004] 用于改良这些微生物的生产性质的方法是诱变、选择及突变体选择等方法。以此方式获得对抗代谢物有抗性或对重要调控代谢物是营养缺陷的并产生L-氨基酸的菌株。已知的抗代谢物是赖氨酸类似物S-(2-氨基乙基)-L-半胱氨酸(AEC)。

[0005] 一段时间以来,重组DNA技术的方法也已经用于棒杆菌属、特别是谷氨酸棒杆菌或者肠杆菌属、特别是大肠杆菌的生产L-氨基酸的菌株改良,通过修饰、即增强或弱化各个氨基酸生物合成基因及研究对氨基酸生产的作用而进行改良。

[0006] 许多细菌的染色体的核苷酸序列已经被公开。

[0007] 谷氨酸棒杆菌ATCC13032基因组的核苷酸序列在Ikeda and Nakagawa (*Applied Microbiology and Biotechnology*62,99-109 (2003))、EP1108790及Kalinowski et al. (*Journal of Biotechnology*104 (1-3), (2003))中描述。

[0008] 谷氨酸棒杆菌R基因组的核苷酸序列在Yukawa et al. (*Microbiology*153 (4): 1042-1058 (2007))中描述。

[0009] *Corynebacterium efficiens*基因组的核苷酸序列在Nishio et al (*Genome Research*.13 (7), 1572-1579 (2003))中描述。

[0010] 白喉棒杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)NCTC13129基因组的核苷酸序列由Cerdeno-Tarraga et al. (*Nucleic Acids Research*31 (22), 6516-6523 (2003))描述。

[0011] *Corynebacterium jeikeum*基因组的核苷酸序列由Tauch et al. (*Journal of Bacteriology*187 (13), 4671-4682 (2005))描述。

[0012] 关于发酵生产L-氨基酸的各个方面的综述可见于R.Faurie and J.Thommel in *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, volume79 (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (Germany) 2003) 描述。

[0013] 在谷氨酸棒杆菌的工业发酵上清中发现大量分泌的海藻糖。这种外部积累的海藻糖不被细胞代谢再循环。因此,就工业发酵中的最大可实现的产物形成及在发酵罐中达到的生物量浓度而言,所述外部积累的海藻糖均代表显著的损失。

[0014] 外部积累的海藻糖的利用是期望的主要目标。实现这个目标具有多个可能的正面结果:(1)在发酵结束时保持未使用的底物碳的利用,(2)增加发酵中可实现的生物量,(3)

增加在生物技术生产过程中的产物产量,即氨基酸的产生,(4)在发酵结束时避免产物上清中不希望的污染。

[0015] 因此,本发明的一个目的是提供发酵制备有机化合物的改良的微生物和方法。

[0016] 本发明提供了产生和/或分泌有机化合物的微生物,其中所述微生物与特定的起始菌株相比,其中具有海藻糖输入蛋白(importer)活性的ABC转运蛋白的一或多个蛋白质亚基的表达增加,所述微生物能从培养基中摄取海藻糖。

[0017] 本发明进一步提供了发酵制备有机化合物的方法,包括如下步骤:

[0018] a) 将上述本发明的微生物在合适的培养基中培养,获得发酵液,及

[0019] b) 积累步骤a)的发酵液中的所述有机化合物;

[0020] 其中所述发酵液中海藻糖的积累被降低或避免。优选使所述发酵液中海藻糖的积累与特定微生物起始菌株相比降低50%或更多,70%或更多,80%或更多,90%或更多,95%或更多,98%或更多,99%或更多,最优选99.5%或更多。

[0021] 本发明在如下方面是有利的,即(1)海藻糖形式的底物碳在本发明中被利用,而若在其他情况中,海藻糖形式的底物碳在发酵结束时在发酵液中保持未被利用;(2)发酵中可达到的生物量是增加的;(3)生物技术生产过程中的产物产量即氨基酸的生产增加;及(4)避免了在发酵结束时产物上清中不希望的污染。

[0022] 令人惊奇地,已经在谷氨酸棒杆菌中鉴定了海藻糖摄取系统。使用相应的生产菌株,编码海藻糖输入系统的操纵子的所有基因的增强表达导致靶产物(有机化合物)增加。令人惊奇地,当仅一个亚基(例如通透酶亚基)被表达时也发现相应的海藻糖摄取。本发明因此提供了这样的微生物,其细胞通过质膜中的活性转运系统摄取外部积累的海藻糖。事实是谷氨酸棒杆菌具有代谢细胞质中海藻糖的代谢能力,导致本发明的上述优势。优选地,所述微生物与所述微生物的特定起始菌株相比能降低、特别是避免介质(培养基)中海藻糖的积累。

[0023] 在所述微生物的一个优选实施方案中,具有海藻糖输入蛋白活性的ABC转运蛋白衍生自谷氨酸棒杆菌。

[0024] 具有海藻糖输入蛋白活性的ABC转运蛋白的蛋白质亚基如下:整合膜蛋白(通透酶),ATP-结合及水解(ATPase)蛋白,及周质(或脂蛋白)底物结合蛋白。ABC转运蛋白的组成如下:两个通透酶,两个ATPase及一个周质(或脂蛋白)底物结合蛋白。所述两个通透酶和ATPase在每种情况中可具有不同的氨基酸序列。

[0025] 本发明的微生物的一个优选实施方案与特定的起始菌株相比,其中具有海藻糖输入蛋白活性的ABC转运蛋白的所有蛋白质亚基的表达均增加。这意味着优选具有海藻糖输入蛋白活性的ABC转运蛋白的通透酶、ATPase和周质亚基的表达均增加,即是过表达的。

[0026] 在另一实施方案中,本发明的微生物与特定的起始菌株相比,其中具有海藻糖输入蛋白活性的ABC转运蛋白的一或多个蛋白质亚基的表达增加。此外,编码具有海藻糖输入蛋白活性的ABC转运蛋白的亚基的操纵子的基因的表达可增加,所述基因不一定编码ABC转运蛋白亚基本身。

[0027] 更加优选地提供了这样的微生物,所述微生物与特定的起始菌株相比,其中选自a)-f)中的至少一种多核苷酸的表达增加:

[0028] a) 编码具有与SEQ ID NO:2或14所示氨基酸序列具有至少70%相同性的氨基酸序

列的多肽的多核苷酸；

[0029] b) 编码具有与SEQ ID NO:4或16所示氨基酸序列具有至少70%相同性的氨基酸序列的多肽的多核苷酸；

[0030] c) 编码具有与SEQ ID NO:6或18所示氨基酸序列具有至少70%相同性的氨基酸序列的多肽的多核苷酸；

[0031] d) 编码具有与SEQ ID NO:8或20所示氨基酸序列具有至少70%相同性的氨基酸序列的多肽的多核苷酸；

[0032] e) 编码具有与SEQ ID NO:10或22所示氨基酸序列具有至少70%相同性的氨基酸序列的多肽的多核苷酸；

[0033] f) 编码具有与SEQ ID NO:12或24所示氨基酸序列具有至少70%相同性的氨基酸序列的多肽的多核苷酸。

[0034] 优选地进一步提供了这样的微生物,所述微生物与特定的起始菌株相比,其中选自a)、b)、d)、e)中的至少一种多核苷酸的表达增加:

[0035] a) 编码具有与SEQ ID NO:2或14所示氨基酸序列具有至少70%相同性的氨基酸序列的多肽的多核苷酸；

[0036] b) 编码具有与SEQ ID NO:4或16所示氨基酸序列具有至少70%相同性的氨基酸序列的多肽的多核苷酸；

[0037] d) 编码具有与SEQ ID NO:8或20所示氨基酸序列具有至少70%相同性的氨基酸序列的多肽的多核苷酸；

[0038] e) 编码具有与SEQ ID NO:10或22所示氨基酸序列具有至少70%相同性的氨基酸序列的多肽的多核苷酸。

[0039] 在进一步优选的实施方案中,所述微生物与特定的起始菌株相比,其中选自b)、d)和e)中的至少一种多核苷酸的表达增加:

[0040] b) 编码具有与SEQ ID NO:4或16所示氨基酸序列具有至少70%相同性的氨基酸序列的多肽的多核苷酸；

[0041] d) 编码具有与SEQ ID NO:8或20所示氨基酸序列具有至少70%相同性的氨基酸序列的多肽的多核苷酸；

[0042] e) 编码具有与SEQ ID NO:10或22所示氨基酸序列具有至少70%相同性的氨基酸序列的多肽的多核苷酸。

[0043] 特别优选地,所述微生物与特定的起始菌株相比,其中如下多核苷酸的表达增加:

[0044] d) 编码具有与SEQ ID NO:8或20所示氨基酸序列具有至少70%相同性的氨基酸序列的多肽的多核苷酸;和/或

[0045] e) 编码具有与SEQ ID NO:10或22所示氨基酸序列具有至少70%相同性的氨基酸序列的多肽的多核苷酸。

[0046] 进一步地,所述微生物的优选的实施方案与特定起始菌株相比,其中多核苷酸a)和b)的表达增加:

[0047] a) 编码具有与SEQ ID NO:2或14所示氨基酸序列具有至少70%相同性的氨基酸序列的多肽的多核苷酸；

[0048] b) 编码具有与SEQ ID NO:4或16所示氨基酸序列具有至少70%相同性的氨基酸序

列的多肽的多核苷酸；

[0049] 及多核苷酸d) 和/或e) 的表达增加；

[0050] d) 编码具有与SEQ ID NO:8或20所示氨基酸序列具有至少70%相同性的氨基酸序列的多肽的多核苷酸；

[0051] e) 编码具有与SEQ ID NO:10或22所示氨基酸序列具有至少70%相同性的氨基酸序列的多肽的多核苷酸。

[0052] 进一步优选地, 本发明提供了这样的微生物, 其与特定的起始菌株相比, 其中多核苷酸a)、b)、c)、d) 和e) 及适当时f) 的表达增加。

[0053] 有机化合物在本发明中是指维生素, 如硫胺(维生素B1), 核黄素(维生素B2), 氰钴胺(维生素B12), 叶酸(维生素M), 生育酚(维生素E) 或者烟酸/烟碱, 核苷或核苷酸如S-腺苷-甲硫氨酸, 肌苷5' - 一磷酸和鸟苷5' - 一磷酸, L-氨基酸, 或者胺如尸胺。优选产生L-氨基酸及含有其的产物。

[0054] 由本发明的微生物产生和/或分泌的有机化合物优选选自维生素, 核苷或核苷酸, L-氨基酸和胺。

[0055] 术语L-氨基酸包括蛋白质氨基酸及L-鸟氨酸和L-高丝氨酸。蛋白质L-氨基酸是指在天然蛋白质中存在的L-氨基酸, 即在微生物、植物、动物和人的蛋白质中。蛋白质氨基酸包括L-天冬氨酸, L-天冬酰胺, L-苏氨酸, L-丝氨酸, L-谷氨酸, L-谷氨酰胺, L-甘氨酸, L-丙氨酸, L-半胱氨酸, L-缬氨酸, L-甲硫氨酸, L-异亮氨酸, L-亮氨酸, L-酪氨酸, L-苯丙氨酸, L-组氨酸, L-赖氨酸, L-色氨酸, L-精氨酸, L-脯氨酸, 及在一些情况中L-硒代半胱氨酸和L-吡咯赖氨酸。

[0056] 所述有机化合物特别优选选自蛋白质L-氨基酸, L-鸟氨酸和L-高丝氨酸。特别优选选自L-赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-缬氨酸、L-脯氨酸、L-谷氨酸和L-异亮氨酸, 特别是L-赖氨酸的蛋白质L-氨基酸。

[0057] 在下文提及的术语氨基酸或L-氨基酸也包含其盐, 例如在L-赖氨酸的情况中的赖氨酸一盐酸盐或者赖氨酸硫酸盐。

[0058] 所述微生物优选选自细菌、酵母和真菌, 特别优选棒杆菌属细菌和肠杆菌科细菌, 特别优选的是谷氨酸棒杆菌。

[0059] 在进一步优选的实施方案中, 编码具有海藻糖输入蛋白活性的ABC转运蛋白的蛋白质亚基的多核苷酸的表达通过选自如下的一或多种措施而增加：

[0060] a) 所述基因的表达在启动子控制下, 所述启动子与所述基因的原始启动子相比在用于所述方法的微生物中的作用强；

[0061] b) 增加编码具有海藻糖输入蛋白活性的多肽的基因的拷贝数, 优选通过将所述基因以增加的拷贝数插入质粒中和/或通过将所述基因的至少一个拷贝整合进所述微生物的染色体中而进行；

[0062] c) 使用核糖体结合位点表达所述基因, 所述核糖体结合位点与所述基因的原始核糖体结合位点相比在用于所述方法的微生物中作用强；

[0063] d) 所述基因的表达通过优化用于所述方法的微生物密码子选择而实现；

[0064] e) 所述基因的表达通过降低由所述基因转录的mRNA中的mRNA二级结构而实现；

[0065] f) 所述基因的表达通过消除由所述基因转录的mRNA中的RNA聚合酶终止子序列而

实现;

[0066] g) 所述基因的表达通过在由所述基因转录的mRNA中使用mRNA稳定化序列而实现。

[0067] 上述增加表达的措施可以合适方式组合。优选通过组合选自a)、b)和c)的至少两种措施、特别优选组合措施a)和b),以增加编码具有海藻糖输入蛋白活性的ABC转运蛋白的蛋白质亚基的多核苷酸的表达。

[0068] 如上所述,本发明还涉及发酵制备有机化合物的方法,包括如下步骤:

[0069] a) 将上述本发明微生物在合适培养基中培养,获得发酵液,及

[0070] b) 积累步骤a)的发酵液中的所述有机化合物;

[0071] 其中所述发酵液中海藻糖的积累被降低或避免。

[0072] 优选地,与特定的微生物起始菌株相比,本发明的微生物使所述发酵液中海藻糖的积累降低50%或更多,70%或更多,80%或更多,90%或更多,95%或更多,98%或更多,99%或更多,及最优选99.5%或更多。

[0073] 在优选的方法中,根据如下I-VIII的定义之一,用于培养的微生物与特定起始菌株相比一或多个多核苷酸的表达增加:

[0074] I:与特定起始菌株相比选自a)-f)中的多核苷酸的表达增加:

[0075] a) 编码具有与SEQ ID NO:2或14所示氨基酸序列具有至少70%相同性的氨基酸序列的多肽的多核苷酸;

[0076] b) 编码具有与SEQ ID NO:4或16所示氨基酸序列具有至少70%相同性的氨基酸序列的多肽的多核苷酸;

[0077] c) 编码具有与SEQ ID NO:6或18所示氨基酸序列具有至少70%相同性的氨基酸序列的多肽的多核苷酸;

[0078] d) 编码具有与SEQ ID NO:8或20所示氨基酸序列具有至少70%相同性的氨基酸序列的多肽的多核苷酸;

[0079] e) 编码具有与SEQ ID NO:10或22所示氨基酸序列具有至少70%相同性的氨基酸序列的多肽的多核苷酸;

[0080] f) 编码具有与SEQ ID NO:12或24所示氨基酸序列具有至少70%相同性的氨基酸序列的多肽的多核苷酸;

[0081] II:与特定起始菌株相比选自a)、b)、d)和e)中的多核苷酸的表达增加;

[0082] III:与特定起始菌株相比选自b)、d)和e)中的多核苷酸的表达增加;

[0083] IV:与特定起始菌株相比多核苷酸d)和/或e)的表达增加;

[0084] V:与特定起始菌株相比多核苷酸a)、b)、d)和e)的表达增加;

[0085] VI:与特定起始菌株相比多核苷酸a)、b)、d)的表达增加;

[0086] VII:与特定起始菌株相比多核苷酸a)、b)、e)的表达增加;

[0087] VIII:与特定起始菌株相比多核苷酸a)-e)及适当时f)的表达增加。

[0088] 本发明优选从所述发酵液中产生液体或固体形式产物。

[0089] 如上所述,术语微生物包括细菌、酵母和真菌。在细菌中,可以特别提及的是棒杆菌属和肠杆菌科细菌。

[0090] 在棒杆菌属中,优选基于如下物种的菌株:

[0091] *Corynebacterium efficiens*,例如模式菌株DSM44549,

- [0092] 谷氨酸棒杆菌,例如模式菌株ATCC13032或者菌株R,及
- [0093] 产氨棒杆菌(*Corynebacterium ammoniagenes*),例如菌株ATCC6871,
- [0094] 特别优选谷氨酸棒杆菌物种。
- [0095] 本领域已知一些代表性谷氨酸棒杆菌物种,其也有不同的名称。这些菌株包括如:
- [0096] 菌株ATCC13870,称作嗜乙酰乙酸棒杆菌(*Corynebacterium acetoacidophilum*),
- [0097] 菌株DSM20137,称作百合棒杆菌(*Corynebacterium lilium*),
- [0098] 菌株ATCC17965,称作*Corynebacterium melassecola*,
- [0099] 菌株ATCC14067,称作黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*),
- [0100] 菌株ATCC13869,称作乳发酵短杆菌(*Brevibacterium lactofermentum*),及
- [0101] 菌株ATCC14020,称作*Brevibacterium divaricatum*。
- [0102] 术语“产谷氨酸小球菌(*Micrococcus glutamicus*)”同样用于谷氨酸棒杆菌。
- [0103] *Corynebacterium efficiens*的一些代表性物种在本领域也称作嗜热产氨棒杆菌(*Corynebacterium thermoaminogenes*),例如菌株FERM BP-1539。
- [0104] 用于过表达海藻糖输入蛋白的微生物或菌株(起始菌株)优选已经具有在细胞中浓缩希望的L-氨基酸或者将其分泌进周围营养培养基中并在此积累其的能力。在下文也使用“产生”这个词语。更特别地,用于过表达的菌株具有在 $\leq$ (不超过)120小时、 $\leq$ 96小时、 $\leq$ 48小时、 $\leq$ 36小时、 $\leq$ 24小时或者 $\leq$ 12小时内在细胞中浓缩或者在营养培养基中积累 $\geq$ (至少)0.10g/l、 $\geq$ 0.25g/l、 $\geq$ 0.5g/l、 $\geq$ 1.0g/l、 $\geq$ 1.5g/l、 $\geq$ 2.0g/l、 $\geq$ 4g/l或者 $\geq$ 10g/l希望的化合物的能力。起始菌株优选是通过诱变和选择、通过重组DNA技术或者通过组合这两种方法产生的菌株。
- [0105] 本领域技术人员理解适于本发明的微生物也可以这样获得,即首先在野生型菌株中如在谷氨酸棒杆菌模式菌株ATCC13032中或者在菌株ATCC14067中过表达海藻糖输入蛋白,然后通过本领域描述的进一步遗传措施使得所述微生物产生希望的L-氨基酸。仅用提及的多核苷酸转化野生型菌株不构成本发明的措施。
- [0106] 举例的分泌或产生L-赖氨酸的谷氨酸棒杆菌菌株是:
- [0107] 谷氨酸棒杆菌MH20-22B(=DSM16835),在Menkel et al. (*Applied and Environmental Microbiology*55(3),684-688(1989))中描述,保藏号为DSM16835;
- [0108] 谷氨酸棒杆菌DM1729,在Georgi et al. (*Metabolic Engineering*7,291-301(2005))和EP1717616A2中描述,保藏号为DSM17576;
- [0109] 谷氨酸棒杆菌DSM13994,在US6,783,967中描述;及
- [0110] 谷氨酸棒杆菌DM1933,在Blombach et al. (*Appl Environ Microbiol.*2009Jan;75(2):419-27)中描述。
- [0111] 举例的分泌或产生L-赖氨酸的*Corynebacterium efficiens*物种菌株是:
- [0112] 嗜热产氨棒杆菌AJ12521(=FERM BP-3304),在US5,250,423中描述。
- [0113] 产生L-赖氨酸的微生物典型具有反馈抗性或者去敏感的天冬氨酸激酶。反馈抗性天冬氨酸激酶是指这样的天冬氨酸激酶(LysC),其与野生形式(野生型)对比示出对赖氨酸与苏氨酸的混合物或者AEC(氨乙基半胱氨酸)与苏氨酸的混合物或者单独的赖氨酸或者单独的AEC的抑制作用具有较低的敏感性。编码与野生型相比去敏感的这些天冬氨酸激酶的基因或等位基因也称作LysC^{FBR}等位基因。在谷氨酸棒杆菌物种的天冬氨酸激酶的情况下,

合适的野生型是菌株ATCC13032。本领域描述了编码与野生型蛋白质相比具有氨基酸取代的天冬氨酸激酶变体的许多lysC^{FBR}等位基因。棒杆菌属细菌中的lysC基因也被称作ask基因。由肠杆菌中lysC基因编码的天冬氨酸激酶也称作天冬氨酸激酶III。

[0114] 含有关于谷氨酸棒杆菌天冬氨酸激酶蛋白质中氨基酸取代导致去敏感化的信息的详细列表在W02009141330中描述。优选的天冬氨酸激酶变体携带选自如下的氨基酸取代：在第380位氨基酸位置的L-异亮氨酸取代为L-苏氨酸，及任选在第381位置的L-苯丙氨酸取代为L-丝氨酸，在第311位的L-异亮氨酸取代为L-苏氨酸，及在第279位的L-苏氨酸取代为L-丙氨酸。

[0115] 含有关于大肠杆菌天冬氨酸激酶III蛋白质中氨基酸取代导致对L-赖氨酸抑制作用去敏感化的信息的详细列表在EP0834559A1第三页(第29-41行)描述。优选的天冬氨酸激酶变体含有在氨基酸序列第323位L-天冬氨酸代替甘氨酸，和/或第318位L-异亮氨酸代替L-甲硫氨酸。

[0116] 举例的分泌或产生L-甲硫氨酸的谷氨酸棒杆菌物种的菌株是：

[0117] 谷氨酸棒杆菌DSM17322，在W02007/011939中描述。

[0118] 举例的产生或分泌L-色氨酸的已知代表性棒杆菌细菌菌株是：

[0119] 谷氨酸棒杆菌K76(=Ferm BP-1847)，在US5,563,052中描述；

[0120] 谷氨酸棒杆菌BPS13(=Ferm BP-1777)，在US5,605,818中描述；及

[0121] 谷氨酸棒杆菌Ferm BP-3055，在US5,235,940中描述。

[0122] 举例的产生或分泌L-缬氨酸的已知代表性棒杆菌细菌菌株是：

[0123] 乳发酵短杆菌FERM BP-1763，在US5,188,948中描述；

[0124] 乳发酵短杆菌FERM BP-3007，在US5,521,074中描述；

[0125] 谷氨酸棒杆菌FERM BP-3006，在US5,521,074中描述；及

[0126] 谷氨酸棒杆菌FERM BP-1764，在US5,188,948中描述。

[0127] 举例的产生或分泌L-异亮氨酸的已知代表性棒杆菌细菌菌株是：

[0128] 黄色短杆菌FERM BP-760，在US4,656,135中描述；

[0129] 黄色短杆菌FERM BP-2215，在US5,294,547中描述；及

[0130] 谷氨酸棒杆菌FERM BP-758，在US4,656,135中描述。

[0131] 举例的产生或分泌L-高丝氨酸的已知代表性棒杆菌细菌菌株是：

[0132] 产谷氨酸小球菌ATCC14296，在US3,189,526中描述；

[0133] 产谷氨酸小球菌ATCC14297，在US3,189,526中描述。

[0134] 产生或分泌尸胺的微生物在例如W02007/113127中描述。

[0135] 具有海藻糖输入蛋白活性的ABC转运蛋白是指具有多个亚基的蛋白质或蛋白质复合物，其催化海藻糖从周围环境中转运至微生物的细胞中。

[0136] ABC转运蛋白构成最大的膜蛋白家族之一，其共同的结构元件是ATP-结合盒，及其主动转运特定底物穿过细胞膜。转运ABC转运蛋白的对抗浓度梯度需要的能量通过结合并水解ATPase单位上的ATP而产生。

[0137] 原核ABC转运蛋白的结构通常由三部分组成：两个整合膜蛋白(通透酶)，每个蛋白均具有5-7个跨膜节段，两个结合并水解ATP(ATPase)的另外的蛋白质，及一个周质底物结合蛋白(或者锚定膜的脂蛋白)。所述三部分的一些基因构成操纵子。因此ABC转运蛋白首先

属于初级主动转运蛋白 (primarily active transporters), 其次属于膜结合的ATPase。

[0138] 公开的数据库如UniProtKB (Universal Protein Resource Knowledgebase) 数据库含有极为不同的生物体的ABC转运蛋白的描述。UniProtKB数据库由UniProt consortium 维护, 其包括European Bioinformatics Institute (EBI, Wellcome Trust, Hinxton Cambridge, United Kingdom)、Swiss Institute of Bioinformatics (SIB, Centre Medical Universitaire, Geneva, Switzerland) 及Protein Information Resource (PIR, Georgetown University, Washington, DC, US)。

[0139] 海藻糖输入蛋白的基因可以借助于聚合酶链反应 (PCR) 使用合适的引物自生物体分离。操作指南可见于Newton and Graham (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Germany, 1994) 的“PCR”实验室手册及在W02006/100211中第14-17页描述。

[0140] 本发明利用来自棒杆菌的海藻糖输入蛋白的基因。优选使用编码具有海藻糖输入蛋白活性的多肽的基因, 其氨基酸序列与选自SEQ ID NO: 2、4、6、8、10及适当时SEQ ID NO: 12或14、16、18、20、22、24的氨基酸序列 $\geq$ (至少) 50%、 $\geq$ 60%、 $\geq$ 70%、 $\geq$ 80%、 $\geq$ 90%、 $\geq$ 92%、 $\geq$ 94%、 $\geq$ 96%、 $\geq$ 97%、 $\geq$ 98%、 $\geq$ 99%相同。在本发明的研究中, 鉴定了编码谷氨酸棒杆菌的海藻糖输入蛋白的操纵子。编码谷氨酸棒杆菌中海藻糖输入蛋白的操纵子具有多个读框或基因。

[0141] 表1概括了关于编码谷氨酸棒杆菌海藻糖输入蛋白的操纵子的读框的信息。

[0142] 表1: 编码谷氨酸棒杆菌海藻糖输入蛋白的操纵子的基因/读框

[0143]

操纵子中读框的名称	编码	长度(氨基酸残基数)	SEQ ID NO:
cg0835 (msik2)	ATPase	332	2
cg0834	周质底物结合蛋白	424	4
cg0833	未知	151	6
cg0832	通透酶	344	8
cg0831	通透酶	278	10
cg0830	假定的读框	74	12

[0144] 读框的基因组排列在图1中示出, 该区域的序列以SEQ ID NO: 25表示。

[0145] 从化学的观点上看, 基因是多核苷酸。编码蛋白质/多肽的多核苷酸在本文与术语“基因”同义使用。

[0146] 一个优选的微生物实施方案过表达编码选自如下a)-f)的一或多种多肽的一或多个基因:

[0147] a)

[0148] i) 由SEQ ID NO: 2所示氨基酸序列组成或包含其的多肽;

[0149] ii) 具有与i)所示氨基酸序列具有至少70%相同性的氨基酸序列的多肽, 所述多肽是具有海藻糖输入蛋白活性的蛋白质复合物的亚基;

[0150] iii) 具有与SEQ ID NO: 2所示氨基酸序列相比缺失、取代、插入和/或添加1-66、1-33、1-17、1-7个氨基酸残基的氨基酸序列的多肽, 所述多肽是具有海藻糖输入蛋白活性的蛋白质复合物的亚基;

[0151] b)

[0152] i) 由SEQ ID NO: 4所示氨基酸序列组成或包含其的多肽;

[0153] ii) 具有与i)所示氨基酸序列具有至少70%相同性的氨基酸序列的多肽,所述多肽是具有海藻糖输入蛋白活性的蛋白质复合物的亚基;

[0154] iii) 具有与SEQ ID NO:4所示氨基酸序列相比缺失、取代、插入和/或添加1-85、1-42、1-21、1-9个氨基酸残基的氨基酸序列的多肽,所述多肽是具有海藻糖输入蛋白活性的蛋白质复合物的亚基;

[0155] c)

[0156] i) 由SEQ ID NO:6所示氨基酸序列组成或包含其的多肽;

[0157] ii) 具有与i)所示氨基酸序列具有至少70%相同性的氨基酸序列的多肽,所述多肽是具有海藻糖输入蛋白活性的蛋白质复合物的亚基;

[0158] iii) 具有与SEQ ID NO:6所示氨基酸序列相比缺失、取代、插入和/或添加1-30、1-15、1-6、1-3个氨基酸残基的氨基酸序列的多肽,所述多肽是具有海藻糖输入蛋白活性的蛋白质复合物的亚基;

[0159] d)

[0160] i) 由SEQ ID NO:8所示氨基酸序列组成或包含其的多肽;

[0161] ii) 具有与i)所示氨基酸序列具有至少70%相同性的氨基酸序列的多肽,所述多肽是具有海藻糖输入蛋白活性的蛋白质复合物的亚基;

[0162] iii) 具有与SEQ ID NO:8所示氨基酸序列相比缺失、取代、插入和/或添加1-69、1-34、1-17、1-7个氨基酸残基的氨基酸序列的多肽,所述多肽是具有海藻糖输入蛋白活性的蛋白质复合物的亚基;

[0163] e)

[0164] i) 由SEQ ID NO:10所示氨基酸序列组成或包含其的多肽;

[0165] ii) 具有与i)所示氨基酸序列具有至少70%相同性的氨基酸序列的多肽,所述多肽是具有海藻糖输入蛋白活性的蛋白质复合物的亚基;

[0166] iii) 具有与SEQ ID NO:10所示氨基酸序列相比缺失、取代、插入和/或添加1-56、1-28、1-14、1-6个氨基酸残基的氨基酸序列的多肽,所述多肽是具有海藻糖输入蛋白活性的蛋白质复合物的亚基;

[0167] f)

[0168] i) 由SEQ ID NO:12所示氨基酸序列组成或包含其的多肽;

[0169] ii) 具有与i)所示氨基酸序列具有至少70%相同性的氨基酸序列的多肽,所述多肽是具有海藻糖输入蛋白活性的蛋白质复合物的亚基;

[0170] iii) 具有与SEQ ID NO:12所示氨基酸序列相比缺失、取代、插入和/或添加1-15、1-8、1-4、1-2个氨基酸残基的氨基酸序列的多肽,所述多肽是具有海藻糖输入蛋白活性的蛋白质复合物的亚基。

[0171] 优选的实施方案包括与上述氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同性的变体,即至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的氨基酸位置与上述氨基酸序列的那些位置是相同的。相同性百分比优选在氨基酸或核酸全长计算。本领域技术人员有许多基于算法多样性的程序,用于序列对比。在本文中,Needleman和Wunsch或者Smith和Waterman的算法产生特别可靠的结果。程序PileUp(J.Mol.Evolution.,25,351-360,1987,Higgins et al.,CABIOS,51989:

151-153) 或者程序Gap和BestFit [Needleman and Wunsch (J.Mol.Biol.48;443-453 (1970)) 及Smith和Waterman (Adv.Appl.Math.2;482-489 (1981))], 其是GCG软件包的一部分 [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991)], 可用于序列的排列对比。上文列出的序列相同性百分比优选是使用GAP程序对完整序列计算的。

[0172] 在适当的情况中, 优选保守氨基酸取代。在芳香族氨基酸的情况中, 保守取代是其中苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸彼此取代。在疏水性氨基酸的情况中, 保守取代是其中亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸彼此取代。在极性氨基酸的情况中, 保守取代是其中谷氨酰胺和天冬酰胺彼此取代。在碱性氨基酸的情况中, 保守取代是其中精氨酸、赖氨酸和组氨酸彼此取代。在酸性氨基酸的情况中, 保守取代是其中天冬氨酸和谷氨酸彼此取代。在含有羟基的氨基酸的情况中, 保守取代是其中丝氨酸和苏氨酸彼此取代。

[0173] 此外可以使用这样的多核苷酸, 其在严格条件下与和SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11互补的核苷酸序列杂交, 优选与SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11的编码区杂交, 且编码是海藻糖输入蛋白一部分的多肽。

[0174] 关于核酸或多核苷酸杂交的指导可见于来自Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Germany, 1993) 的手册“The DIG System Users Guide for Filter Hybridization”及在Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41:255-260 (1991)) 中描述。杂交在严格条件下发生, 是指仅在这样的情况下形成杂交体, 即其中探针即包含与SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、优选SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11的编码区互补的核苷酸序列的多核苷酸与靶序列即由所述探针处理或鉴定的多核苷酸具有至少70%的相同性。已知杂交、包括洗涤步骤的严格性受改变缓冲液成分、温度和盐浓度的影响或由这些条件决定。杂交反应通常用与洗涤步骤相比相对较低的严格条件进行 (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996)。

[0175] 例如, 可将温度为大约50°C-68°C的5×SSC缓冲液用于杂交反应。在此, 探针也可以与和所用探针的核苷酸序列具有低于70%相同性的多核苷酸杂交。这种杂交体不太稳定, 可通过在严格条件下洗涤除去。这可以例如通过将盐浓度降低至2×SSC或1×SSC及在适当情况中随后降低至0.5×SSC而实现 (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany, 1995), 温度为大约50°C-68°C, 大约52°C-68°C, 大约54°C-68°C, 大约56°C-68°C, 大约58°C-68°C, 大约60°C-68°C, 大约62°C-68°C, 大约64°C-68°C, 大约66°C-68°C。优选温度范围是大约64°C-68°C或者大约66°C-68°C。任选可以降低盐浓度至相应于0.2×SSC或0.1×SSC的浓度。所述SSC缓冲液任选含有十二烷基硫酸钠(SDS), 浓度为0.1%。通过以大约1-2°C的梯度从50°C至68°C逐步增加杂交温度, 可以分离与所用探针的序列或互补序列至少70%、至少80%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%及适当时100%相同及编码是海藻糖输入蛋白一部分的多肽的多核苷酸片段。关于杂交的进一步的操作指南可以在市场上以“试剂盒”形式获得 (例如来自Roche Diagnostics GmbH的DIG Easy Hyb, Mannheim, Germany, Catalogue No.1603558)。

[0176] 对于本发明, 将编码海藻糖输入蛋白的一部分的基因在产生希望的氨基酸的微生物或者起始或亲代菌株中过表达。

[0177] 过表达通常是指与起始菌株(亲代菌株)或野生型菌株(如果是起始菌株的话)相比核糖核酸、蛋白质(多肽)或者酶的胞内浓度或活性的增加。起始菌株(亲代菌株)是指对其已经进行了导致过表达的菌株。

[0178] 对于过表达,优选重组过表达方法。这些方法包括其中使用在体外提供的DNA分子制备微生物的所有方法。举例的这种DNA分子包括启动子、表达盒、基因、编码区等。其通过转化、缀合、转导或细丝的方法转移进希望的微生物中。

[0179] 过表达使相应多肽的活性或浓度基于在导致过表达的措施实施之前的菌株中所述多肽的活性或浓度通常增加至少10%、25%、50%、75%、100%、150%、200%、300%、400%或500%,优选至多1000%、2000%、4000%、10000%或20000%。

[0180] 过表达是通过本领域可利用的多种方法实现的。这些方法包括增加拷贝数或者修饰指导或控制基因表达的核苷酸序列。基因的转录由启动子控制,任选由抑制(阻抑物蛋白)或促进(激活物蛋白)转录的蛋白质控制。形成的RNA的翻译由核糖体结合位点和起始密码子控制。包含启动子和核糖体结合位点及任选起始密码子的多核苷酸或DNA分子也称作表达盒。

[0181] 可以通过在微生物的细胞质中复制的质粒来增加拷贝数。为此,本领域针对极为不同的微生物类别描述了许多质粒,所述质粒可用于设定希望的基因拷贝数的增加。适于肠杆菌属的质粒在例如Molecular Biology, Labfax (Ed.: T.A. Brown, Bios Scientific, Oxford, UK, 1991) 中描述。适于棒杆菌属的质粒在例如 Tauch et al. (Journal of Biotechnology 104 (1-3), 27-40, (2003)) 或者 Stansen et al. (Applied and Environmental Microbiology 71, 5920-5928 (2005)) 中描述。

[0182] 拷贝数可以通过将进一步的拷贝导入微生物的染色体中而增加至少一个(1)拷贝。适于棒杆菌的方法在例如专利W003/014330、W003/040373和W004/069996中描述。举例的适于肠杆菌属的方法是将基因拷贝插入噬菌体的att位点中(Yu and Court, Gene 223, 77-81 (1998)), 借助于噬菌体Mu的染色体扩增, 如EP0332448所述, 或者借助于条件复制的质粒的基因置换方法, 如Hamilton et al. (Journal of Bacteriology 174, 4617-4622 (1989)) 或Link et al. (Journal of Bacteriology 179, 6228-6237 (1997)) 所述。

[0183] 基因表达可通过使用强启动子进一步增加, 所述启动子与被表达的基因功能性连接。优选使用比天然启动子即存在于野生型或亲代菌株中的启动子强的启动子。为此, 本领域有许多可利用的方法。

[0184] “功能性连接”在本文中是指启动子与基因的相继排列, 导致所述基因表达并控制其表达。

[0185] 适于棒杆菌属的启动子可以见于Morinaga et al. (Journal of Biotechnology 5, 305-312, (1987))、专利文献EP0629699A2、US2007/0259408A1、W02006/069711、EP1881076A1和EP1918378A1, 及参见如“Handbook of Corynebacterium glutamicum” (Eds.: Lothar Eggeling and Michael Bott, CRC Press, Boca Raton, US (2005)) 或者“Corynebacteria, Genomics and Molecular Biology” (Ed.: Andreas Burkovski, Caister Academic Press, Norfolk, UK (2008)) 的综述。举例的使得可以受控的即可诱导或可抑制的表达的启动子在例如Tsuchiya and Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)) 中描述。

[0186] 这种启动子或表达盒典型地与基因编码区的起始密码子的第一个核苷酸上游相隔1-1000个、优选1-500个核苷酸应用。

[0187] 另外可以将多个启动子置于希望的基因的上游或者将其与被表达的基因功能性连接,以此方式实现增加的表达。见例如专利W02006/069711所述。

[0188] 大肠杆菌启动子的结构为本领域熟知。因此可以通过核苷酸的一或多个取代和/或一或多个插入和/或一或多个缺失而修饰其序列以增加启动子的强度。例如可见“Herder Lexikon der Biologie”(Spektrum Akademischer Verlag,Heidelberg,Germany(1994))所述。

[0189] 举例的增加在棒杆菌中表达的启动子的修饰可见于US6,962,805B2及出版物Vasicová et al. (Bacteriol.1999Oct;181(19):6188-91.)所述。通过取代同源启动子增强靶基因在例如EP1697526B1中描述。

[0190] 谷氨酸棒杆菌核糖体结合位点的结构也为本领域熟知,在例如Amador (Microbiology145,915-924(1999))及在遗传学手册和教科书如“Gene und Klonen”(Winnacker,Verlag Chemie,Weinheim,Germany(1990))或者“Molecular Genetics of Bacteria”(Dale and Park,Wiley and Sons Ltd.,Chichester,UK(2004))中描述。

[0191] 过表达可另外通过增加激活物蛋白的表达或者降低或关闭阻抑物蛋白的表达而实现。

[0192] 提及的过表达措施可以合适的方式互相组合。因此,例如可以组合使用合适的表达盒与增加拷贝数,或者优选使用合适的启动子组合增加拷贝数。

[0193] 关于DNA的操作、DNA的消化和连接、转化体的转化和选择的指导可见于已知的手册Sambrook et al. “Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Second Edition”(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)。

[0194] 表达或过表达的程度可以通过确定多肽的量及确定酶活性测量从所述基因中转录的mRNA的量而确定。

[0195] mRNA的量可以通过使用“Northern印迹”和定量RT-PCR方法确定。定量RT-PCR包括在聚合酶链反应之前的逆转录。为此,可以使用来自Roche Diagnostics (Boehringer Mannheim GmbH,Roche Molecular Biochemicals,Mannheim,Germany)的LightCycler™系统,如在Jungwirth et al. (FEMS Microbiology Letters281,190-197(2008))中描述。蛋白质的浓度可以通过一维和二维蛋白质凝胶分级分离及随后通过合适的评估软件在凝胶中光学鉴定蛋白质浓度而确定。常用的制备棒杆菌的蛋白质凝胶及鉴定所述蛋白质的方法是由Hermann et al. (Electrophoresis,22:1712-23(2001))所述的方法。蛋白质浓度可另外通过Western印迹杂交确定,使用特异于被检测的蛋白质的抗体(Sambrook et al., Molecular cloning:a laboratory manual.2nd Ed.Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1989),及随后使用相应软件光学评估进行浓度确定(Lohaus and Meyer(1998)Biospektrum 5:32-39;Lottspeich,Angewandte Chemie321:2630-2647(1999))。

[0196] 产生的微生物可以连续培养,如W005/021772所述;或者间断分批培养(分批培养)或者补料分批培养或者重复补料分批培养,以产生希望的有机化合物。关于已知的培养方法的一般性质的概述在Chmiel (Bioprozesstechnik1.Einführung in die

Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) 教科书或者在 Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Brunswick/Wiesbaden, 1994)) 教科书中描述。

[0197] 使用的培养基或者发酵培养基必须以合适方式满足各个菌株的需要。关于各种微生物的培养基的描述见 American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) 的“Manual of Methods for General Bacteriology”所述。术语培养基和发酵培养基可互换使用。

[0198] 糖和碳水化合物如葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、麦芽糖、糖蜜、来自甜菜或蔗糖生产的含蔗糖溶液、淀粉、淀粉水解物和纤维素、油和脂肪如大豆油、葵花油、花生油和椰子油、脂肪酸如棕榈酸、硬脂酸和亚油酸、醇如甘油、甲醇和乙醇以及有机酸如乙酸或乳酸可以用作碳源。

[0199] 有机含氮化合物如蛋白胨、酵母膏、肉膏、麦芽汁、玉米浆、大豆粉和尿素，或者无机化合物如硫酸铵、氯化铵、磷酸铵、碳酸铵和硝酸铵，可以用作氮源。氮源可以单独使用或作为混合物使用。

[0200] 磷酸、磷酸二氢钾或者磷酸氢二钾或者相应的含钠盐可以用作磷源。

[0201] 培养基必须进一步含有生长所需的盐，例如金属如钠、钾、镁、钙和铁氯化物或硫酸盐形式，例如硫酸镁或硫酸铁。最终，除了上述物质以外还可以采用必需生长因子如氨基酸例如高丝氨酸和维生素，例如硫胺素、生物素或泛酸。

[0202] 所述起始物质可以以单批形式加入到培养物中，或者可以在培养期间以合适方式补料。

[0203] 可以以合适方式采用碱性化合物如氢氧化钠、氢氧化钾、氨或氨水或者酸性化合物如磷酸或硫酸以控制培养物的pH。pH通常调节至6.0-9.0，优选6.5-8。可以采用防沫剂例如脂肪酸聚乙二醇酯以控制泡沫产生。为了保持质粒稳定性，可以在培养基中加入合适的选择性作用的物质例如抗生素。发酵优选在需氧条件下进行。为维持这些条件，氧气或含氧气体混合物如空气被引入培养物中。使用富含过氧化氢的液体也是可以的。发酵任选地在增压下进行，例如在0.03-0.2MPa的增压压力下。培养温度通常是20℃-45℃，优选25℃-40℃，特别优选30℃-37℃。在分批方法中，优选培养持续直至形成足以回收量的希望的有机化合物。这个目标通常在10小时至160小时内达到。在连续方法中，更长培养时间是可能的。微生物的活性导致发酵培养基和/或所述微生物的细胞中有机化合物的浓缩(积累)。

[0204] 合适的发酵培养基的实例可见于专利US5,770,409、US5,990,350、US5,275,940、W02007/012078、US5,827,698、W02009/043803、US5,756,345和US7,138,266。

[0205] 确定在发酵期间一或多个时间L-氨基酸浓度的分析可以通过利用离子交换层析分离L-氨基酸，优选阳离子交换层析，及随后使用茚三酮的柱后衍生化进行，如Spackman et al. (Analytical Chemistry 30:1190-1206 (1958)) 所述。也可以应用邻苯二甲醛而不是茚三酮进行柱后衍生化。关于离子交换层析的综述可见于Pickering (LC • GC (Magazine of Chromatographic Science) 7 (6), 484-487 (1989))。

[0206] 也可以进行柱前衍生化，例如使用邻苯二甲醛或异硫氰酸苯酯，及通过反相层析(RP)、优选高效液相层析(HPLC)形式分级分离所得氨基酸衍生物。这种类型的方法在例如Lindroth et al. (Analytical Chemistry 51:1167-1174 (1979)) 中描述。

[0207] 使用光度学进行检测(吸光度,荧光性)。

[0208] 关于氨基酸分析的综述可见于Lottspeich and Zorbas的教科书“Bioanalytik”(Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Germany 1998)。

[0209] 本发明的方法或发酵过程关于选自如下一或多个参数方面的性能,基于使用含有增加的海藻糖输入蛋白活性的微生物的方法或发酵过程增加至少0.5%、至少1%、至少1.5%或至少2%,所述参数为:浓度(每单位体积形成的化合物),产量(消耗的每单位碳源形成的化合物),形成(formation)(每单位体积和时间形成的化合物)及比形成(specific formation)(每单位干细胞物质或干生物量形成的化合物,或者每单位细胞蛋白质和时间形成的化合物),或者其它参数及这些参数的组合。

[0210] 所述发酵措施导致发酵液中含有希望的有机化合物,优选L-氨基酸。

[0211] 然后提供或产生或回收液体或固体形式的含有有机化合物的产物。

[0212] 发酵液是指发酵培养基或营养培养基,微生物在其中在一定温度培养一定时间。在发酵期间使用的发酵培养基或培养基包含保证希望的化合物产生及典型地保证其增殖和存活的所有物质或成分。

[0213] 当发酵完成时,所得发酵液因此包含:

[0214] a) 微生物的生物量(细胞量),所述生物量由于所述微生物细胞的增殖而产生,

[0215] b) 在发酵期间形成的希望的有机化合物,

[0216] c) 在发酵期间形成的有机副产物,及

[0217] d) 使用的发酵培养基或者起始物质的组成成分,如维生素如生物素或盐如硫酸镁,其在发酵中未被消耗。

[0218] 所述有机副产物包括由发酵中所用微生物除了特定的希望的化合物之外产生及任选分泌的物质。这些物质也包括糖,如海藻糖。

[0219] 从培养容器或发酵罐中取出发酵液,适当收集,并用于提供液体或固体形式的含有有机化合物的产物,优选含有L-氨基酸的产物。短语“回收含有L-氨基酸的产物”也用于描述这个行为。在最简便的情况中,已经从发酵罐中取出的含有L-氨基酸的发酵液自身组成回收的产物。

[0220] 从发酵液中进行选自如下的一或多项措施实现希望的有机化合物的浓缩和纯化,以此方式分离具有希望含量的所述化合物的产物:

[0221] a) 部分(>0%至<80%)至完全(100%)或者几乎完全($\geq 80\%$ 、 $\geq 90\%$ 、 $\geq 95\%$ 、 $\geq 96\%$ 、 $\geq 97\%$ 、 $\geq 98\%$ 、 $\geq 99\%$)除去水,

[0222] b) 部分(>0%至<80%)至完全(100%)或者几乎完全($\geq 80\%$ 、 $\geq 90\%$ 、 $\geq 95\%$ 、 $\geq 96\%$ 、 $\geq 97\%$ 、 $\geq 98\%$ 、 $\geq 99\%$)除去生物量,后者任选在除去之前是失活的,

[0223] c) 部分(>0%至<80%)至完全(100%)或几乎完全($\geq 80\%$ 、 $\geq 90\%$ 、 $\geq 95\%$ 、 $\geq 96\%$ 、 $\geq 97\%$ 、 $\geq 98\%$ 、 $\geq 99\%$ 、 $\geq 99.3\%$ 、 $\geq 99.7\%$)除去在发酵期间形成的有机副产物,及

[0224] d) 部分(>0%)至完全(100%)或几乎完全($\geq 80\%$ 、 $\geq 90\%$ 、 $\geq 95\%$ 、 $\geq 96\%$ 、 $\geq 97\%$ 、 $\geq 98\%$ 、 $\geq 99\%$ 、 $\geq 99.3\%$ 、 $\geq 99.7\%$)除去在发酵中未被消耗的所用发酵培养基或起始物质的组成成分。

[0225] 部分(>0%至<80%)至完全(100%)或者几乎完全($\geq 80\%$ 至<100%)除去水(a措施)也称作干燥。

[0226] 在所述方法的一个变化中,完全或几乎完全除去水、生物量、有机副产物和未消耗的所用发酵培养基的组成成分导致纯的($\geq 80\%$ 重量、 $\geq 90\%$ 重量)或高纯度($\geq 95\%$ 重量、 $\geq 97\%$ 重量、 $\geq 99\%$ 重量)的希望有机化合物的产物形式,优选L-氨基酸。本领域可获得关于措施a)、b)、c)和d)的大量技术指导。

[0227] 在L-氨基酸的情况下,本领域已知四种不同的产物形式。

[0228] 一组含有L-赖氨酸的产物包括纯化的L-赖氨酸(EP-B-0534865)的浓缩的碱性水溶液。另一组如US6,340,486和US6,465,025所述,包括含有L-赖氨酸发酵液的含有生物量浓缩物的酸性水溶液。众所周知的固体产物包括粉状或结晶形式的纯化的纯L-赖氨酸,其典型是盐形式,如L-赖氨酸单盐酸盐。另一组固体产物形式在例如EP-B-0533039中描述。其中描述的产物形式除了L-赖氨酸之外包含在发酵生产期间使用及未消耗的大多数起始物质,及在适当时所用微生物的生物量比例为 $>0\%$ - 100% 。

[0229] 已知各种适于不同产物形式的加工方法以从发酵液中制备含有L-赖氨酸的产物或者纯化的L-赖氨酸。

[0230] 用于产生纯的固体L-赖氨酸的方法是离子交换层析,在适当时使用活性炭,以及结晶化方法。以此方式获得相应的碱或相应的盐如单盐酸盐(Lys-HCl)或者硫酸赖氨酸(Lys₂-H₂SO₄)。

[0231] EP-B-0534865描述了从发酵液中产生含有L-赖氨酸的碱性水溶液的方法。在其中所述的方法中,从发酵液中分离生物量并弃去。碱如氢氧化钠、氢氧化钾或氢氧化铵用于将pH设定为9-11。在浓缩后通过结晶化从发酵液中除去最小组成成分(无机盐)并冷却,用作肥料或弃去。

[0232] 在通过使用棒杆菌属细菌产生赖氨酸的方法中,优选的方法是获得包含发酵液的组成成分的产物的那些方法。这些物质特别用作动物饲料添加剂。

[0233] 根据需要可以将生物量从发酵液中完全或部分除去,通过分离方法如离心、过滤、倾析或者组合这些方法进行,或者完全留在其中。在适当时,所述生物量或含有生物量的发酵液在合适的加工步骤中被失活,例如通过热处理(加热)或者添加酸处理。

[0234] 在一种方法中,生物量被完全或几乎完全除去,以便在制备的产物中不剩余(0%)或至多剩余 30% 、至多 20% 、至多 10% 、至多 5% 、至多 1% 或至多 0.1% 的生物量。在另一种方法中,生物量不被除去,或者仅小部分被除去,以便制备的产物中剩余所有(100%)或多于 70% 、 80% 、 90% 、 95% 、 99% 或 99.9% 的生物量。因此,在本发明的一种方法中,生物量除去的比例是 $\geq 0\%$ 至 $\leq 100\%$ 。

[0235] 最后,在发酵后获得的发酵液在完全或部分除去生物量之前或之后可以调节为酸性pH,使用无机酸如盐酸、硫酸或磷酸,或者用有机酸如丙酸(GB1,439,728或EP1331220)。也可以酸化具有完全含量生物量的发酵液。最后,发酵液可以通过加入硫酸氢钠(NaHSO₃, GB1,439,728)或者另外的盐如亚硫酸的铵、碱金属或碱土金属的盐而稳定化。

[0236] 在除去生物量期间,发酵液中存在的任何有机或无机固体被部分或完全除去。溶解于发酵液中的有机副产物及溶解的未消耗的发酵培养基的组成成分(起始物质),在产物中至少部分剩余($>0\%$),优选剩余至少 25% 、特别优选至少 50% 及极特别优选至少 75% 。在适当时其在产物中完全(100%)或几乎完全即 $>95\%$ 或 $>98\%$ 或 $>99\%$ 剩余。在这个意义上,如果产物包含至少一部分发酵液的组成成分,这也被术语“基于发酵液的产物”所描述。

[0237] 随后,从发酵液中除去水,或者将发酵液增稠或浓缩,通过已知方法如使用旋转式蒸发器、薄膜蒸发器、降膜蒸发器、通过反渗透或者通过纳米过滤进行。然后将此浓缩的发酵液渐渐达到自由流动产物,特别是细粉末或优选粗颗粒,通过冻干、喷雾干燥、喷雾粒化或者通过如PCT/EP2004/006655所述循环流化床中举例的其它方法进行。适当时从所得颗粒中通过筛选或除尘法分离希望的产物。

[0238] 也可以直接干燥发酵液,即不通过喷雾干燥或喷雾粒化而预先浓缩。

[0239] “自由流动”是指粉末在一系列不同孔径的玻璃孔容器中至少无障碍地从具有5mm(毫米)孔径的容器中流出(Klein:Seifen,Öle,Fette,Wachse94,12(1968))。

[0240] “细”是指粉末大多数(>50%)具有颗粒直径为20-200 μm 。

[0241] “粗”是指产物大多数(>50%)具有颗粒直径为200-2000 μm 。

[0242] 颗粒大小可以通过激光衍射光谱学确定。相应的方法在教科书“Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis”[particle size measurement in laboratory practice]by R.H.Müller and R.Schuhmann,Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart(1996)或者在教科书“Introduction to Particle Technology”by M.Rhodes,published by Wiley&Sons(1998)中描述。

[0243] 自由流动的细粉末随后可以通过合适的压实或粒化方法转变为粗的、非常自由流动的、耐贮存的及基本无尘的产物。

[0244] 术语“无尘”是指产物仅包含小比例(<5%)的直径低于100 μm 的颗粒。

[0245] 在本发明中“耐贮存的”是指产物在干燥和冷却环境中可以贮存至少1年或更长时间,优选至少1.5年或更长时间,特别优选2年或更长时间,而基本不出现(至多5%)相应氨基酸的丧失。

[0246] 本发明进一步涉及基本如W02007/042363A1所述方法。为此,使用根据本发明获得的发酵液进行该方法,从中已经完全或部分除去的生物量,所述方法包括如下步骤:

[0247] a) 通过加入硫酸使发酵液中pH降低至4.0-5.2,特别是4.9-5.1,硫酸盐/L-赖氨酸的摩尔比率为0.85-1.2,优选0.9-1.0,特别优选>0.9至<0.95,在适当时加入一或多种进一步的含有硫酸盐的化合物,及

[0248] b) 将以此方式获得的混合物通过除去水而浓缩,适当时粒化,

[0249] 在适当时在步骤a)之前进行如下一或两种措施:

[0250] c) 测量硫酸盐/L-赖氨酸的摩尔比率,以确定含有硫酸盐的化合物的需要量,

[0251] d) 加入适当比率的选自硫酸铵、重硫酸铵和硫酸的含有硫酸盐的化合物。

[0252] 在适当时,在步骤b)之前,加入硫酸盐,优选碱金属亚硫酸氢盐,特别优选亚硫酸氢钠,浓度为基于发酵液的0.01-0.5%重量,优选0.1-0.3%重量,特别优选0.1-0.2%重量。

[0253] 在上述步骤中应提及的优选的含有硫酸盐的化合物特别是硫酸铵和/或重硫酸铵,或者氨水与硫酸的适当的混合物及硫酸自身。

[0254] 硫酸盐/L-赖氨酸的摩尔比率V是通过下式计算的: $V=2x[\text{SO}_4^{2-}]/[\text{L-赖氨酸}]$ 。这个化学式考虑到这样的事实,即 SO_4^{2-} 阴离子是双电荷的,或者硫酸是二元酸(dibasic)。比率 $V=1$ 是指存在化学当量组合物 $\text{Lys}_2-(\text{H}_2\text{SO}_4)$,而 $V=0.9$ 是指10%硫酸盐不足, $V=1.1$ 是指10%硫酸盐超量。

[0255] 有利的是在粒化或压实期间使用常用的有机或无机辅助剂或载体,如淀粉、明胶、纤维素衍生物或相似物质,如通常用于加工食物或饲料中作为结合剂、胶凝剂或增稠剂,或者进一步的物质如二氧化硅、硅酸盐 (EP0743016A) 或硬脂酸盐。

[0256] 进一步的优势是用油或脂肪处理所得颗粒的表面,如W004/054381所述。可以使用的油是矿物质油,植物油或植物油混合物。举例的这种油是大豆油、橄榄油、大豆油/卵磷脂混合物。同样,硅酮油、聚乙二醇或羟基纤维素也是合适的。用所述油处理表面实现产物的磨耗抗性增加及尘粒含量降低。产物中油含量基于饲料添加剂总量为0.02-2.0%重量,优选0.02-1.0%重量,特别优选0.2-1.0%重量。

[0257] 优选的产物 $\geq 97\%$ 重量比例的颗粒直径大小为100-1800 μm ,或者 $\geq 95\%$ 重量比率的颗粒直径大小为300-1800 μm 。尘粒比例,即颗粒直径大小 $< 100\mu\text{m}$ 的颗粒,优选 > 0 至1%重量,特别优选不超过0.5%重量。

[0258] 然而,或者,产物也可以吸附于饲料加工中已知及常用的有机或无机载体上,如二氧化硅、硅酸盐、谷物粗粉、麦麸、面粉、淀粉、糖或其他物质,和/或与常用的增稠剂和结合剂混合并稳定化。为此举例的应用和方法在文献 (Die Mühle+Mischfüttertechnik132 (1995) 49,page817) 中描述。

[0259] 最后,产物也可以通过用成膜剂包被为对于动物胃、特别是反刍动物的胃消化稳定的状态,如用金属碳酸盐、二氧化硅、硅酸盐、藻酸盐、硬脂酸盐、淀粉、树胶和纤维素醚包被,如DE-C-4100920所述。

[0260] 为了确定产物中希望的L-赖氨酸浓度,可以根据需求在加工期间加入浓缩物形式的L-赖氨酸,或者适当时加入液体或固体形式的基本纯的物质或者其盐。这些物质可以单独或者作为混合物加入所得或浓缩的发酵液中,或者在干燥或粒化期间加入。

[0261] 本发明进一步涉及制备固体含有赖氨酸的产物,所述方法基本上如US20050220933所述。所述方法包括使用根据本发明获得的发酵液,及包括如下步骤:

[0262] a) 优选用薄膜滤器过滤所述发酵液,获得含有生物量的滤浆和过滤物,

[0263] b) 浓缩过滤物,优选以获得48-52%重量的固体含量,

[0264] c) 使步骤b) 获得的浓缩物粒化,优选在50 $^{\circ}\text{C}$ -62 $^{\circ}\text{C}$ 温度进行,及

[0265] d) 用一或多种包被剂包被在步骤c) 中获得的颗粒。

[0266] 步骤b) 中过滤物的浓缩也可以这样进行,由此获得的固体含量 > 52 至 $\leq 55\%$ 重量, > 55 至 $\leq 58\%$ 重量,或者 > 58 至 $\leq 61\%$ 重量。

[0267] 优选用于步骤d) 中包被的包被剂选自如下一组:

[0268] d1) 在步骤a) 中获得的生物量,

[0269] d2) 含有L-赖氨酸的化合物,优选选自盐酸L-赖氨酸或者硫酸L-赖氨酸,

[0270] d3) 基本无L-赖氨酸的物质,L-赖氨酸含量 $< 1\%$ 重量,优选 $< 0.5\%$ 重量,优选选自淀粉、卡拉胶、琼脂、二氧化硅、硅酸盐、谷物粗粉、麦麸和面粉 (flour),及,

[0271] d4) 防水物质,优选选自油、聚乙二醇和液体石蜡。

[0272] 将L-赖氨酸含量通过相应于步骤d1)-d4)、特别是d1)-d3) 的措施调节为希望数值。

[0273] 在含有L-赖氨酸的产物的制备中,优选调节离子比率以便摩尔离子比率相应于如下化学式:

[0274] $2x[SO_4^{2-}] + [Cl^-] - [NH_4^+] - [Na^+] - [K^+] - 2x[Mg^{2+}] - 2x[Ca^{2+}] / [L-Lys]$

[0275] 比率为0.68-0.95,优选0.68-0.90,特别优选0.68-0.86,如Kushiki et al.在US20030152633中描述。

[0276] 在L-赖氨酸的情况下,以此方式产生的固体产物基于发酵液具有赖氨酸(赖氨酸碱的形式)含量为基于产物干重10%重量至70%重量,或者20%重量至70%重量,优选30%重量至70%重量,及特别优选40%重量至70%重量。最大赖氨酸碱基含量为71%重量,72%重量,73%重量也是可能的。

[0277] 含有L-赖氨酸的固体产物的水含量为直至5%重量,优选直至4%重量,特别优选低于3%重量。

[0278] 菌株DM1729保藏在德国微生物和细胞培养物保藏中心,保藏号为2005年9月16日DSM17576。

[0279] 附图简述

[0280] 图1描述了开放读框cg0835-cg0830的排列对比。所述读框编码如下推定的蛋白质:cg0835:ATPase;cg0834:周质底物结合蛋白;cg0832:通透酶亚基;cg0831:通透酶亚基。

[0281] 图2是表达构建体pXMJ19-cg0831的示意图。下表2概括了使用的缩写和名称及其含义。碱基对数表示在测量再现限制内获得的近似值。

[0282] 表2

[0283]	cat	氯霉素抗性基因
	lacI	编码Lac阻抑物
	Ptac	Tac启动子
	oriCg	谷氨酸棒杆菌质粒pBL1的起源
	ori pUC	大肠杆菌质粒pUC的起源
	TrrnB	rrnB终止子
	cg0831	编码通透酶亚基
	cg0832	编码通透酶亚基
	cg0833	编码未知蛋白质
	cg0834	编码周质底物结合蛋白
	cg0835	编码ATPase

[0284] 图3是用于功能性连接ORF cg0832与Pgap启动子的质粒pK18mobsacB_Pgap_cg0832的示意图。

[0285] 下表3概括了所用缩写和名称及其含义。所用缩写和名称具有如下含义。碱基对数表示在测量再现性限制内获得的近似值。

[0286] 表3

[0287]	Kan:	卡那霉素抗性基因
	NruI	限制酶NruI的裂解位点
	HindIII	限制酶HindIII的裂解位点
	ScaI	限制酶ScaI的裂解位点
	XbaI	限制酶XbaI的裂解位点
	Pgap_cg0832	建立ORF cg0832与Pgap启动子功能性连接的DNA盒

sacB:	sacB-基因
RP4-mob:	含有转移复制起点(oriT)的mob区
oriV:	复制起点V

实施例

[0288] 实施例1:海藻糖摄取系统的鉴定

[0289] 对于放线菌目细菌(其也包括谷氨酸棒杆菌),迄今为止仅针对链霉菌科细菌描述了海藻糖代谢:天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)和*Streptomyces reticuli*利用海藻糖作为碳源。基因表达分析表明由agl3E、agl3F和agl3G编码的ABC转运系统的成分在天蓝色链霉菌中及ATPase亚基MsiK在*S. reticuli*中参与海藻糖摄取。对谷氨酸棒杆菌基因组序列进行的Blast分析鉴定了与*S. reticuli msiK* (GenBank accession no.CAA70125)高度同源的两个开放读框(cg2708和cg0835):由cg2708编码的谷氨酸棒杆菌蛋白质与*S. reticuli MsiK*具有59%相同性(e-值 $7e-125$),但是是MusEFGK₂麦芽糖转运蛋白的ATP结合蛋白MusE,其缺失不影响海藻糖的利用。由cg0835编码的第二种蛋白质与*S. reticuli MsiK* (e-值 $8e-112$)同样具有58%的高度相同性。天蓝色链霉菌agl3E、agl3F和agl3G(登记号NP_631226、NP_631225、NP_631224)与谷氨酸棒杆菌基因组序列的序列对比未产生任何进一步有意义的结果(例如与催化甘油3-磷酸摄取的ABC摄取系统UgpAEBC的基因及麦芽糖摄取系统MusEFGK₂的基因的25%-32%相同性)。

[0290] 作为在谷氨酸棒杆菌中可能的海藻糖摄取系统,序列对比分析因此产生了开放读框cg0835和开放读框cg0834、cg0832和cg0831,其在基因组序列中的位置紧密相邻,编码底物结合蛋白和仍未鉴定的ABC转运蛋白的两个通透酶成分(见图1排列)。

[0291] 实施例2:载体pXMJ19_cg0831的构建

[0292] 含有读框cg0832、cg0834、cg0833、cg0832和cg0831的表达构建体是利用校正(proof-reading)聚合酶(PRECISOR High-Fidelity DNA Polymerase, Biocat, Heidelberg, Germany)通过扩增相应基因区并且将其连接进pJet克隆载体(Fermentas, St. Leon-Roth, Germany)中而制备的。

[0293] 为此,使用如下合成的寡核苷酸(引物):

[0294] 引物cg0831for (SEQ ID NO:30):

[0295] 5`GCTCTAGATGCGTTCTGCTCCTGACCTT3`

[0296] 引物cg0831rev (SEQ ID NO:31):

[0297] 5`CGGGATCCTTTGCGTTGCGATTTCGGATT3`

[0298] 所示引物是由MWG Biotech (Ebersberg, Germany)合成的。在每种情况中,下划线处是限制酶XbaI和BamHI的识别序列。

[0299] 然后将获得的片段通过限制酶XbaI和BamHI (New England Biolabs, Schwalbach, Germany)从pJet载体中切除,连接进预先用XbaI和BamHI线性化的pXMJ19表达载体(Jakoby et al., 1999)中,然后用Antarctic磷酸酶(New England Biolabs, Schwalbach, Germany)去磷酸化。之后用5 μ l所述连接混合物转化感受态大肠杆菌DH5 α mcr细胞。通过对制备的质粒进行限制酶切而筛选所获得的克隆以得到含有希望的插入体的那些克隆。该质粒被命名为pXMJ19_cg0831(见图2)。

[0300] 实施例3:谷氨酸棒杆菌菌株DM1933/pXMJ19和DM1933/pXMJ19_cg0831的制备

[0301] 使用Liebl et al. (FEMS Microbiological Letters, 53:299-303 (1989)) 所述电穿孔方法,将实施例2中描述的质粒pXMJ19和pXMJ19_cg0831电穿孔进谷氨酸棒杆菌DM1933中。

[0302] DM1933菌株是谷氨酸棒杆菌ATCC13032的氨基乙基半胱氨酸抗性突变体,已经在出版物中描述(Blombach et al., 2009, Appl. and Env. Microbiol., p. 419-427)。

[0303] 携带质粒的细胞通过将电穿孔混合物铺板于补加7.5mg/l氯霉素的LB琼脂(Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)上进行选择。在每种情况中,通过常用的方法从一个转化体中分离质粒DNA (Peters-Wendisch et al., 1998, Microbiology, 144, 915-927),随后用琼脂糖凝胶电泳通过限制裂解检测。

[0304] 获得的菌株称作DM1933/pXMJ19和DM1933/pXMJ19_cg0831。所述pXMJ19_cg0831构建体含有读框cg0832、cg0834、cg0833、cg0832和cg0831。实施例4:L-赖氨酸的产生

[0305] 将在实施例3中获得的谷氨酸棒杆菌菌株DM1933/pXMJ19和DM1933/pXMJ19_cg0831在适于赖氨酸产生的营养培养基中培养,确定培养上清中赖氨酸含量。

[0306] 为此,首先将菌株在含有合适抗生素的琼脂平板(具有氯霉素(7.5mg/l)的脑-心琼脂)上在33℃保温24小时。从这个琼脂平板培养物开始,接种预培养物(10ml培养基于100ml锥形瓶中)。用于预培养和主培养的培养基是加入了氯霉素(7.5mg/l)的MM培养基。

[0307] 表4示出了使用的培养基成分的概况。

[0308] 表4:MM培养基

[0309]	CSL (玉米浆)	5 g/l
	MOPS (吗啉丙磺酸)	20 g/l
	葡萄糖(高压蒸汽灭菌分离的)	50 g/l
	盐:	
	(NH ₄) ₂ SO ₄	25 g/l
	KH ₂ PO ₄	0.1 g/l
	MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1.0 g/l
	CaCl ₂ * 2 H ₂ O	10 mg/l
	FeSO ₄ * 7 H ₂ O	10 mg/l
	MnSO ₄ * H ₂ O	5.0 mg/l
	生物素(灭菌过滤的)	0.3 mg/l
	硫胺素* HCl (灭菌过滤的)	0.2 mg/l
	CaCO ₃	25 g/l

[0310] 使用氨水将CSL、MOPS和盐溶液调节为pH7并高压灭菌。然后加入灭菌的底物和维生素溶液及干燥的高压灭菌的CaCO₃。

[0311] 将预培养物在摇床上在250rpm和33℃保温24小时。从这个预培养物中接种主要培养物,由此主要培养物的起始OD (660nm) 为0.10D。

[0312] 在具有隔板的100ml锥形瓶中以10ml体积在33℃和80%湿度进行培养。

[0313] 在20和40小时后,使用Biomek1000 (Beckmann Instruments GmbH, Munich) 测量

660nm波长的OD。使用来自Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Germany) 的氨基酸分析仪,通过离子交换层析和柱后衍生化及茚三酮检测确定产生的赖氨酸的量。使用来自Dionex GmbH (65510 Idstein, Germany) 的分析仪通过HPLC确定海藻糖浓度。表5示出实验结果。

[0314] 表5:L-赖氨酸的产生和海藻糖浓度的测量。所有数值均是用列出的菌株进行的3个独立实验的平均值;n.d.=未确定。

菌株	L-赖氨酸 HCl(g/l)		OD (660nm)		海藻糖(g/l)	
	20 h	40 h	20 h	40 h	20 h	40 h
DM1933 / pXMJ19	11.84	13.65	14.04	13.12	n.d.	3.13
DM1933 / pXMJ19_cg0831	11.82	14.89	14.62	13.7	n.d.	0

[0316] 结果表明当使用海藻糖输入蛋白表达菌株从海藻糖中产生赖氨酸时,海藻糖不再作为副产物而产生。

[0317] 实施例5:载体pK18mobsacB_Pgap_cg0832的构建

[0318] 相应于过表达基因cg0831和cg0832的核苷酸序列 (SEQ ID NO:26) 的一个1701bp DNA片段在GENEART AG (Regensburg, Germany) 通过从头基因合成而制备。

[0319] 第613-1095位置的核苷酸描述了来自申请US20080050786 (SEQ ID NO:20) 的启动子片段,其中NruI限制酶的裂解位点通过将位置1079的核碱基胸腺嘧啶突变为核碱基鸟嘌呤、位置1080的核碱基胸腺嘧啶突变为核碱基胞嘧啶、位置1081的核碱基胸腺嘧啶突变为核碱基鸟嘌呤而产生。此外,ScaI限制酶的裂解位点是通过在启动子序列的5'末端加入接头序列 (SEQ ID NO:28) 产生的,位于第607-612位置。将以此方式获得的489bp启动子片段与基因cg0832的起始密码子功能性连接。

[0320] 所述构建体在启动子下游区具有600bp侧翼序列 (位置1096-1695),及在上游区的600bp侧翼序列 (位置7-606),以通过同源重组整合启动子。

[0321] 将含有限制酶XbaI (位置1-6) 和HindIII (位置1696-1701) 裂解位点的序列加入两侧区域,从而使得该构建体被克隆进置换载体pK18mobsacB中。

[0322] 将所述1701bp片段用XbaI和HindIII限制酶消化,然后亚克隆进如Schäfer et al. (Gene, 145, 69-73 (1994)) 所述可动员的载体pK18mobsacB中,以使得所述启动子整合在基因cg0832的上游。为此,将pK18mobsacB用XbaI和HindIII限制酶消化。将以此方式制备的载体与所述片段混合,将混合物用Ready-To-Go T4DNA连接酶试剂盒 (Amersham-Pharmacia, Freiburg, Germany) 处理。

[0323] 随后,将大肠杆菌菌株S17-1 (Simon et al., Bio/Technology 1:784-791, 1993) 用连接混合物转化 (Hanahan, In. DNA cloning. A practical approach. Vol.1. IRL-Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989)。携带质粒的细胞通过将转化混合物铺板于补加50mg/l卡那霉素的LB琼脂上进行选择 (Sambrook et al., Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor, New York, 1989)。

[0324] 借助于来自Qiagen的QIAprep Spin Miniprep试剂盒从转化体中分离质粒DNA,并通过用XbaI和HindIII酶限制性裂解及随后的琼脂糖凝胶电泳进行检测。该质粒被称作pK18mobsacB_Pgap_cg0832,在图3中示出。

[0325] 实施例6:谷氨酸棒杆菌菌株DM1933_Pgap_cg0832的制备

[0326] 目的是将突变Pgap_cg0832导入菌株谷氨酸棒杆菌DM1933中。菌株DM1933是谷氨酸棒杆菌ATCC13032的氨基乙基半胱氨酸抗性突变体,已经在出版物中描述(Blombach et al.,2009,Appl.and Env.Microbiol.,p.419-427)。

[0327] 将实施例5中所述的载体pK18mobsacB_Pgap_cg0832根据Schäfer et al. (Journal of Microbiology172:1663-1666 (1990))所述方案通过缀合转移进谷氨酸棒杆菌菌株DM1933中。所述载体在DM1933中不能自主复制,只有在其由于重组而已经被整合进染色体中时才保留在细胞中。选择转接合子,即具有整合的pK18mobsacB_Pgap_cg0832的克隆,通过将所述缀合混合物铺板于补加25mg/l卡那霉素和50mg/l萘啶酸的LB琼脂上进行选择。然后将卡那霉素抗性转接合子在补加卡那霉素(25mg/l)的LB琼脂平板上划线,在33℃保温24小时。选择其中质粒由于二次重组事件已经被切除的突变体,通过将克隆在液体LB培养基中非选择性培养30小时,然后将其在补加10%蔗糖的LB琼脂上划线,在33℃保温24小时。

[0328] 质粒pK18mobsacB_Pgap_cg0832,与起始质粒pK18mobsacB一样,除了卡那霉素抗性基因之外还含有编码枯草芽孢杆菌果聚糖蔗糖酶的sacB基因的一个拷贝。蔗糖可诱导的sacB基因的表达导致果聚糖蔗糖酶形成,其催化对谷氨酸棒杆菌毒性的产物果聚糖合成。因此,仅其中由于二次重组事件的结果而已经切除整合的pK18mobsacB_Pgap_cg0832的那些克隆在补加蔗糖的LB琼脂上生长。根据二次重组事件相对于突变位点的位置,突变在切除期间掺入或者宿主染色体保持初始状态。

[0329] 随后,鉴定其中发生希望的置换的克隆,即Pgap_cg0832表达盒掺入染色体中。

[0330] 为此,使用聚合酶链反应(PCR)检测50个克隆的Pgap_cg0832表达盒整合情况,所述克隆具有“在存在蔗糖条件下生长”及“在存在卡那霉素条件下不生长”表型。

[0331] 为此,使用如下合成的寡核苷酸(引物):

[0332] 引物cg0832_1.p (SEQ ID NO:28):

[0333] 5`GCTGGAATACGGAGTGAACC3`

[0334] 引物cg0832_2.p (SEQ ID NO:29):

[0335] 5`GGGATTGCCCAAGGGATAAG3`

[0336] 所示引物是由MWG Biotech (Ebersberg,Germany)合成的。在野生型排列情况中,引物cg0832_1.p和cg0832_2.p使得570bp DNA片段扩增。在将Pgap_cg0832构建体整合进染色体中的情况中,扩增子的大小为1059bp。

[0337] 使用来自Quiagen (Hilden,Germany)的Taq PCR核心试剂盒在Eppendorf Mastercycler (Hamburg,Germany)中进行PCR反应,所述试剂盒包含Thermus aquaticus Taq DNA聚合酶。反应混合物条件根据厂商指导调节。首先将PCR混合物进行最初的变性,在94℃进行2分钟。随后进行35次重复如下步骤:在94℃进行30秒变性步骤,引物与DNA在57℃结合30秒的结合步骤,及使引物在72℃延伸60秒的延伸步骤。在最终的在72℃进行5分钟的延伸步骤后,以此方式扩增的产物通过电泳在琼脂糖凝胶中检测。

[0338] 以此方式鉴定了含有整合形式的Pgap_cg0832表达盒的突变体,获得的菌株之一被命名为谷氨酸棒杆菌DM1933_Pgap_cg0832。

[0339] 实施例7:L-赖氨酸的产生

[0340] 将在实施例6中获得的谷氨酸棒杆菌菌株DM1933_Pgap_cg0832与起始菌株DM1933在适于赖氨酸产生的营养培养基中培养,确定培养上清中的赖氨酸含量。

[0341] 为此,首先将菌株在琼脂(脑-心琼脂)平板上在33℃保温24小时。从这个琼脂平板培养物可是,接种预培养物(10ml培养基于100ml锥形瓶中)。用于预培养和主要培养物的培养基是MM培养基(见表4)。

[0342] 使用氨水将CSL、MOPS和盐溶液调节为pH7并高压蒸汽灭菌。然后加入无菌底物和维生素溶液及干燥高压蒸汽灭菌的CaCO₃。

[0343] 将预培养物在摇床上以250rpm在33℃保温24小时。用这个预培养物接种主培养物,由此主培养物起始OD(660nm)为0.10D。

[0344] 在具有隔板的100ml锥形瓶中在10ml体积进行培养,温度为33℃,湿度为80%。

[0345] 在20和40小时(h)后,使用Biomek1000(Beckmann Instruments GmbH,Munich)确定测量波长为660nm的OD。使用来自Eppendorf-BioTronik(Hamburg,Germany)的氨基酸分析仪,通过离子交换层析及柱后衍生化与茚三酮检测确定产生的赖氨酸的量。使用来自Dionex GmbH(65510Idstein,Germany)的分析仪通过HPLC确定海藻糖浓度。表6描述了实验结果。

[0346] 表6:L-赖氨酸的生产及海藻糖浓度测量。所有数值均是使用列出的菌株的3个独立实验的平均值;n.d.=未确定。

菌株	L-赖氨酸 HCl(g/l)		OD (660nm)		海藻糖(g/l)	
	20 h	40 h	20 h	40 h	20 h	40 h
DM1933	12.83	13.65	14.75	12.19	n.d.	3.03
DM1933_Pgap_cg0832	12.91	14.15	15.11	12.34	n.d.	0

[0348] 结果表明当使用其中仅由cg0832和cg0831编码的海藻糖输入蛋白亚基(在这两种情况中为通透酶亚基)的表达被增强的菌株从海藻糖中产生赖氨酸时,海藻糖不再作为副产物产生。这是希望的产物(L-赖氨酸)的产量增加的进一步的迹象。

序列表

<110> 赢创德固赛有限公司
 <120> 海藻糖输入蛋白
 <130> 201000450
 <160> 31
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 1299
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <221> CDS
 <222> (151)..(1149)
 <223> ATP-bindendes und -hydrolysierendes (ATPase) Protein des
 ABC-Transporters mit der Aktivit 鋗 eines Trehalose-Importers

<400> 1
 ctttgagctt gatgccgccc caaaagagtt gttgccaccg atcgcgaaact ttggcagtag 60
 ccattgcgttc tgcctcctgac ctggaacagc ggtcccaatt tagaccgcgt aaaccacaa 120
 tgtgtactgg tgcctgtaaat ttagtagaac atg gca acg gtc aca ttc gac aag 174
 Met Ala Thr Val Thr Phe Asp Lys
 1 5
 gtc aca atc cgg tac ccc ggc gcg gag cgc gca aca gtt cat gag ctt 222
 Val Thr Ile Arg Tyr Pro Gly Ala Glu Arg Ala Thr Val His Glu Leu
 10 15 20
 gat tta gat atc gct gat ggc gag ttt ttg gtg ctc gtc ggc cct tcg 270
 Asp Leu Asp Ile Ala Asp Gly Glu Phe Leu Val Leu Val Gly Pro Ser
 25 30 35 40
 ggt tgt ggt aaa tcc act acg ctg cgt gct ttg gcg ggg ctt gag ggc 318
 Gly Cys Gly Lys Ser Thr Thr Leu Arg Ala Leu Ala Gly Leu Glu Gly
 45 50 55
 gtg gag tcg ggt gtg atc aaa att gat ggc aag gat gtc act ggt cag 366
 Val Glu Ser Gly Val Ile Lys Ile Asp Gly Lys Asp Val Thr Gly Gln
 60 65 70
 gag ccg gcg gat cgc gat atc gcg atg gtg ttc cag aat tat gct ctg 414
 Glu Pro Ala Asp Arg Asp Ile Ala Met Val Phe Gln Asn Tyr Ala Leu
 75 80 85
 tac cct cac atg acg gtg gcg aag aat atg ggt ttt gcg ctg aag ttg 462
 Tyr Pro His Met Thr Val Ala Lys Asn Met Gly Phe Ala Leu Lys Leu
 90 95 100
 gct aag ctg ccg cag gcg cag atc gat gcg aag gtc aat gag gct gcg 510
 Ala Lys Leu Pro Gln Ala Gln Ile Asp Ala Lys Val Asn Glu Ala Ala
 105 110 115 120
 gaa att ctt ggg ttg acg gag ttt ttg gat cgc aag cct aag gat tta 558
 Glu Ile Leu Gly Leu Thr Glu Phe Leu Asp Arg Lys Pro Lys Asp Leu
 125 130 135
 tcg ggt ggt cag cgt cag cgt gtg gcg atg ggt cgc gcg ttg gtg cgt 606
 Ser Gly Gly Gln Arg Gln Arg Val Ala Met Gly Arg Ala Leu Val Arg
 140 145 150
 gat ccg aag gtg ttc ctc atg gat gag ccg ctg tcc aac ctg gat gcg 654
 Asp Pro Lys Val Phe Leu Met Asp Glu Pro Leu Ser Asn Leu Asp Ala
 155 160 165

[0001]

[0002]	aaa ttg cgc gtg caa acc cgc gcg gag gtc gct gct ttg cag cgt cgc Lys Leu Arg Val Gln Thr Arg Ala Glu Val Ala Ala Leu Gln Arg Arg 170 175 180	702
	ctg ggc acc acc acg gtg tat gtc acc cac gat cag gtt gag gca atg Leu Gly Thr Thr Thr Val Tyr Val Thr His Asp Gln Val Glu Ala Met 185 190 195 200	750
	acg atg ggc gat cgg gtt gcg gtg ctc aag gac ggg ttg ctg cag cag Thr Met Gly Asp Arg Val Ala Val Leu Lys Asp Gly Leu Leu Gln Gln 205 210 215	798
	gtc gca ccg ccc agg gag ctt tac gac gcc ccg gtc aac gaa ttc gtt Val Ala Pro Pro Arg Glu Leu Tyr Asp Ala Pro Val Asn Glu Phe Val 220 225 230	846
	gcg ggc ttc atc ggc tcg ccg tcc atg aac ctc ttc cct gcc aac ggg Ala Gly Phe Ile Gly Ser Pro Ser Met Asn Leu Phe Pro Ala Asn Gly 235 240 245	894
	cac aag atg ggt gtg cgc ccg gag aag atg ctg gtc aat gag acc cct His Lys Met Gly Val Arg Pro Glu Lys Met Leu Val Asn Glu Thr Pro 250 255 260	942
	gag ggt ttc aca agc att gat gct gtg gtg gat atc gtc gag gag ctt Glu Gly Phe Thr Ser Ile Asp Ala Val Val Asp Ile Val Glu Glu Leu 265 270 275 280	990
	ggc tcc gaa tcg tat gtt tat gcc act tgg gag ggc cac cgc ctg gtg Gly Ser Glu Ser Tyr Val Tyr Ala Thr Trp Glu Gly His Arg Leu Val 285 290 295	1038
	gcc cgt tgg gtg gaa ggc ccc gtg cca gcc cct ggc acg cct gtg act Ala Arg Trp Val Glu Gly Pro Val Pro Ala Pro Gly Thr Pro Val Thr 300 305 310	1086
	ttt tcc tat gat gcg gcg cag gcg cat cat ttc gat ctg gag tcg ggc Phe Ser Tyr Asp Ala Ala Gln Ala His His Phe Asp Leu Glu Ser Gly 315 320 325	1134
	gag cgt atc gct tag ttctggacgt ggggaggcgt cgaaaagcat cttattttt Glu Arg Ile Ala 330	1189
	gaccctccgg gggtgattta acctaaaatt ccacacaaac gtgttcgagg tcattagatt	1249
	gataagcatc tgttgtaag aaaggtgact tcctatgtcc tcgatttccc	1299
	<210> 2	
	<211> 332	
	<212> PRT	
	<213> Corynebacterium glutamicum	
	<400> 2	
	Met Ala Thr Val Thr Phe Asp Lys Val Thr Ile Arg Tyr Pro Gly Ala 1 5 10 15	
	Glu Arg Ala Thr Val His Glu Leu Asp Leu Asp Ile Ala Asp Gly Glu 20 25 30	
	Phe Leu Val Leu Val Gly Pro Ser Gly Cys Gly Lys Ser Thr Thr Leu 35 40 45	
	Arg Ala Leu Ala Gly Leu Glu Gly Val Glu Ser Gly Val Ile Lys Ile 50 55 60	

Asp Gly Lys Asp Val Thr Gly Gln Glu Pro Ala Asp Arg Asp Ile Ala
 65 70 75 80
 Met Val Phe Gln Asn Tyr Ala Leu Tyr Pro His Met Thr Val Ala Lys
 85 90 95
 Asn Met Gly Phe Ala Leu Lys Leu Ala Lys Leu Pro Gln Ala Gln Ile
 100 105 110
 Asp Ala Lys Val Asn Glu Ala Ala Glu Ile Leu Gly Leu Thr Glu Phe
 115 120 125
 Leu Asp Arg Lys Pro Lys Asp Leu Ser Gly Gly Gln Arg Gln Arg Val
 130 135 140
 Ala Met Gly Arg Ala Leu Val Arg Asp Pro Lys Val Phe Leu Met Asp
 145 150 155 160
 Glu Pro Leu Ser Asn Leu Asp Ala Lys Leu Arg Val Gln Thr Arg Ala
 165 170 175
 Glu Val Ala Ala Leu Gln Arg Arg Leu Gly Thr Thr Thr Val Tyr Val
 180 185 190
 Thr His Asp Gln Val Glu Ala Met Thr Met Gly Asp Arg Val Ala Val
 195 200 205
 [0003]
 Leu Lys Asp Gly Leu Leu Gln Gln Val Ala Pro Pro Arg Glu Leu Tyr
 210 215 220
 Asp Ala Pro Val Asn Glu Phe Val Ala Gly Phe Ile Gly Ser Pro Ser
 225 230 235 240
 Met Asn Leu Phe Pro Ala Asn Gly His Lys Met Gly Val Arg Pro Glu
 245 250 255
 Lys Met Leu Val Asn Glu Thr Pro Glu Gly Phe Thr Ser Ile Asp Ala
 260 265 270
 Val Val Asp Ile Val Glu Glu Leu Gly Ser Glu Ser Tyr Val Tyr Ala
 275 280 285
 Thr Trp Glu Gly His Arg Leu Val Ala Arg Trp Val Glu Gly Pro Val
 290 295 300
 Pro Ala Pro Gly Thr Pro Val Thr Phe Ser Tyr Asp Ala Ala Gln Ala
 305 310 315 320
 His His Phe Asp Leu Glu Ser Gly Glu Arg Ile Ala
 325 330
 <210> 3
 <211> 1575
 <212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum	
<220>	
<221> CDS	
<222> (151)..(1425)	
<223> periplasmatisches (oder Lipoprotein) Substrat-bindendes Protein des ABC-Transporters mit der Aktivit 鋗 eines Trehalose-Importers	
<400> 3	
cgagcgtatc gcttagtttc ggacgtgggg aggcgtcgaa aagcatcttt atttttgacc	60
ctccgggggt gatttaacct aaaattccac acaaacgtgt tcgaggtcat tagattgata	120
agcatctggt gttaagaaag gtgacttcct atg tcc tcg att tcc cgc aag acc	174
Met Ser Ser Ile Ser Arg Lys Thr	
1 5	
ggc gcg tca ctt gca gcc acc aca ctg ttg gca gcg atc gca ctg gcc	222
Gly Ala Ser Leu Ala Ala Thr Leu Leu Ala Ala Ile Ala Leu Ala	
10 15 20	
ggt tgt agt tca gac tca agc tcc gac tcc aca gat tcc acc gct agc	270
Gly Cys Ser Ser Asp Ser Ser Ser Asp Ser Thr Asp Ser Thr Ala Ser	
25 30 35 40	
gaa ggc gca gac agc cgc ggc ccc atc acc ttt gcg atg ggc aaa aac	318
Glu Gly Ala Asp Ser Arg Gly Pro Ile Thr Phe Ala Met Gly Lys Asn	
45 50 55	
gac acc gac aaa gtc att ccg atc atc gac cgc tgg aac gaa gcc cac	366
Asp Thr Asp Lys Val Ile Pro Ile Ile Asp Arg Trp Asn Glu Ala His	
60 65 70	
ccc gat gag cag gta acg ctc aac gaa ctc gcc ggt gaa gcc gac gcg	414
Pro Asp Glu Gln Val Thr Leu Asn Glu Leu Ala Gly Glu Ala Asp Ala	
75 80 85	
cag cgc gaa acc ctc gtg caa tcc ctg cag gcc ggc aac tct gac tac	462
Gln Arg Glu Thr Leu Val Gln Ser Leu Gln Ala Gly Asn Ser Asp Tyr	
90 95 100	
gac gtc atg gcg ctc gac gtc atc tgg acc gca gac ttc gcg gca aac	510
Asp Val Met Ala Leu Asp Val Ile Trp Thr Ala Asp Phe Ala Ala Asn	
105 110 115 120	
caa tgg ctc gca cca ctt gaa ggc gac ctc gag gta gac acc tcc gga	558
Gln Trp Leu Ala Pro Leu Glu Gly Asp Leu Glu Val Asp Thr Ser Gly	
125 130 135	
ctg ctg caa tcc acc gtg gat tcc gca acc tac aac ggc acc ctc tac	606
Leu Leu Gln Ser Thr Val Asp Ser Ala Thr Tyr Asn Gly Thr Leu Tyr	
140 145 150	
gca ctg cca cag aac acc aac ggc cag cta ctg ttc cgc aac acc gaa	654
Ala Leu Pro Gln Asn Thr Asn Gly Gln Leu Leu Phe Arg Asn Thr Glu	
155 160 165	
atc atc cca gaa gca cca gca aac tgg gct gac ctc gtg gaa tcc tgc	702
Ile Ile Pro Glu Ala Pro Ala Asn Trp Ala Asp Leu Val Glu Ser Cys	
170 175 180	
acg ctt gct gaa gaa gca ggc gtt gat tgc ctg acc act cag ctc aag	750
Thr Leu Ala Glu Glu Ala Gly Val Asp Cys Leu Thr Thr Gln Leu Lys	
185 190 195 200	
cag tac gaa ggc ctt tca gtg aac acc atc ggc ttc atc gaa ggt tgg	798
Gln Tyr Glu Gly Leu Ser Val Asn Thr Ile Gly Phe Ile Glu Gly Trp	
205 210 215	
gga ggc agc gtc cta gac gat gac ggc aac gtc acc gta gac agc gac	846
Gly Gly Ser Val Leu Asp Asp Asp Gly Asn Val Thr Val Asp Ser Asp	

[0004]

	220	225	230	
	gac gcc aag gca ggc ctt caa gcg ctt gtc gac ggc ttc gac gac ggc Asp Ala Lys Ala Gly Leu Gln Ala Leu Val Asp Gly Phe Asp Asp Gly			894
	235	240	245	
	acc atc tcc aag gca tcc ctt gca gcg acc gaa gaa gaa acc aac ctc Thr Ile Ser Lys Ala Ser Leu Ala Ala Thr Glu Glu Glu Thr Asn Leu			942
	250	255	260	
	gca ttc acc gaa ggc caa acc gcc tac gcc att aac tgg cca tac atg Ala Phe Thr Glu Gly Gln Thr Ala Tyr Ala Ile Asn Trp Pro Tyr Met			990
	265	270	275	
	tac acc aac tcc gaa gaa gcc gaa gca acc gca ggc aaa ttc gaa gta Tyr Thr Asn Ser Glu Glu Ala Glu Ala Thr Ala Gly Lys Phe Glu Val			1038
	285	290	295	
	cag ccc ctc gta ggt aaa gac ggc gtc ggc gta tcc acc ctt ggt ggc Gln Pro Leu Val Gly Lys Asp Gly Val Gly Val Ser Thr Leu Gly Gly			1086
	300	305	310	
	tac aac aac ggc atc aac gtc aac tcc gaa aac aag gca acc gcc cgc Tyr Asn Asn Gly Ile Asn Val Asn Ser Glu Asn Lys Ala Thr Ala Arg			1134
	315	320	325	
	gac ttc atc gaa ttc atc atc aac gaa gag aac caa acc tgg ttc gcg Asp Phe Ile Glu Phe Ile Ile Asn Glu Glu Asn Gln Thr Trp Phe Ala			1182
	330	335	340	
	gac aac tcc ttc cca cca gtt ctg gca tcc atc tac gat gat gag tcc Asp Asn Ser Phe Pro Pro Val Leu Ala Ser Ile Tyr Asp Asp Glu Ser			1230
	345	350	355	
[0005]	ctt gtt gag cag tac cca tac ctg cca gca ctg aag gaa tcc ctg gaa Leu Val Glu Gln Tyr Pro Tyr Leu Pro Ala Leu Lys Glu Ser Leu Glu			1278
	365	370	375	
	aac gca gca cca cgc cca gtg tct cct ttc tac cca gcc atc tcc aag Asn Ala Ala Pro Arg Pro Val Ser Pro Phe Tyr Pro Ala Ile Ser Lys			1326
	380	385	390	
	gca atc cag gac aac gcc tac gca gcg ctt aac ggc aac gtc gac gtt Ala Ile Gln Asp Asn Ala Tyr Ala Ala Leu Asn Gly Asn Val Asp Val			1374
	395	400	405	
	gac cag gca acc acc gat atg aag gca gcg atc gaa aac gct tcc agc Asp Gln Ala Thr Thr Asp Met Lys Ala Ala Ile Glu Asn Ala Ser Ser			1422
	410	415	420	
	tag ttcgtaatt tagttcattc tccggccacc ttcctgaaa tccttagcgg			1475
	atttcacaa aggtggccgg agttttgtcc tattgttggg tgtaattgaa cttgtgtgaa			1535
	aggagtccgg atggttccg gcaaagatct tcaagtttcc			1575
	<210> 4			
	<211> 424			
	<212> PRT			
	<213> Corynebacterium glutamicum			
	<400> 4			
	Met Ser Ser Ile Ser Arg Lys Thr Gly Ala Ser Leu Ala Ala Thr Thr			
	1 5 10 15			
	Leu Leu Ala Ala Ile Ala Leu Ala Gly Cys Ser Ser Asp Ser Ser Ser			
	20 25 30			

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

[0006]

Ser Glu Asn Lys Ala Thr Ala Arg Asp Phe Ile Glu Phe Ile Ile Asn
 325 330 335

Glu Glu Asn Gln Thr Trp Phe Ala Asp Asn Ser Phe Pro Pro Val Leu
 340 345 350

Ala Ser Ile Tyr Asp Asp Glu Ser Leu Val Glu Gln Tyr Pro Tyr Leu
 355 360 365

Pro Ala Leu Lys Glu Ser Leu Glu Asn Ala Ala Pro Arg Pro Val Ser
 370 375 380

Pro Phe Tyr Pro Ala Ile Ser Lys Ala Ile Gln Asp Asn Ala Tyr Ala
 385 390 395 400

Ala Leu Asn Gly Asn Val Asp Val Asp Gln Ala Thr Thr Asp Met Lys
 405 410 415

Ala Ala Ile Glu Asn Ala Ser Ser
 420

<210> 5
 <211> 756
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

[0007]

<220>
 <221> CDS
 <222> (151)..(606)
 <223> Funktion unbekannt

<400> 5
 aaggcagcga tcgaaaacgc ttccagctag ttcggtaatt tagttcattc tccggccacc 60
 ttccctgaaa tccttagcgg atttcacaaa aggtggccgg agttttgtcc tattgttggg 120
 tgtaattgaa cttgtgtgaa aggagtcagg atg gct tcc ggc aaa gat ctt caa 174
 Met Ala Ser Gly Lys Asp Leu Gln
 1 5

ggt tcc aca ttt ggc tac atc tcc cgc tgc ccc gtg cag gtc tac gaa 222
 Val Ser Thr Phe Gly Tyr Ile Ser Arg Cys Pro Val Gln Val Tyr Glu
 10 15 20

gca atc gca gat ccc aga caa cta gaa cgc tac ttc gcc acc ggc gga 270
 Ala Ile Ala Asp Pro Arg Gln Leu Glu Arg Tyr Phe Ala Thr Gly Gly
 25 30 35 40

gta tct ggc cgc ctc gaa acc gga tcg act gtc tat tgg gac ttc gtt 318
 Val Ser Gly Arg Leu Glu Thr Gly Ser Thr Val Tyr Trp Asp Phe Val
 45 50 55

gat ttt ccc ggt gcg ttt ccg gtc caa gtt gtc tca gct aca cag gct 366
 Asp Phe Pro Gly Ala Phe Pro Val Gln Val Val Ser Ala Thr Gln Ala
 60 65 70

gaa cac att gaa ctc cgc tgg gga caa gca aat gag ctg cgt tcc gtc 414
 Glu His Ile Glu Leu Arg Trp Gly Gln Ala Asn Glu Leu Arg Ser Val
 75 80 85

aac ttc gag ttc gaa cct ttt aga aat ttc acc cgc acg aaa ctc acc 462
 Asn Phe Glu Phe Glu Pro Phe Arg Asn Phe Thr Arg Thr Lys Leu Thr
 90 95 100

	atc acc gaa ggc agt tgg ccg ctc act ccc gca gga gcc caa gag gct Ile Thr Glu Gly Ser Trp Pro Leu Thr Pro Ala Gly Ala Gln Glu Ala 105 110 115 120	510
	ctg ggc agc cag atg gga tgg act ggc atg ctg tcc gca cta aaa gcg Leu Gly Ser Gln Met Gly Trp Thr Gly Met Leu Ser Ala Leu Lys Ala 125 130 135	558
	tgg ctg gaa tac gga gtg aac ctc cgc gac ggg ttt tat aag caa tag Trp Leu Glu Tyr Gly Val Asn Leu Arg Asp Gly Phe Tyr Lys Gln 140 145 150	606
	gcaatgtgtc catcacgatg tgtggcggat tatgatccat gtaacaagaa tgtgcagttt	666
	cacagaactg acaatcaact tattttgacc tgacaaaagg agcgacgaca catggccaca	726
	ttcaaacagg ccagaagcgc tgcctggctg	756
	<210> 6 <211> 151 <212> PRT <213> Corynebacterium glutamicum	
	<400> 6	
	Met Ala Ser Gly Lys Asp Leu Gln Val Ser Thr Phe Gly Tyr Ile Ser 1 5 10 15	
	Arg Cys Pro Val Gln Val Tyr Glu Ala Ile Ala Asp Pro Arg Gln Leu 20 25 30	
[0008]	Glu Arg Tyr Phe Ala Thr Gly Gly Val Ser Gly Arg Leu Glu Thr Gly 35 40 45	
	Ser Thr Val Tyr Trp Asp Phe Val Asp Phe Pro Gly Ala Phe Pro Val 50 55 60	
	Gln Val Val Ser Ala Thr Gln Ala Glu His Ile Glu Leu Arg Trp Gly 65 70 75 80	
	Gln Ala Asn Glu Leu Arg Ser Val Asn Phe Glu Phe Glu Pro Phe Arg 85 90 95	
	Asn Phe Thr Arg Thr Lys Leu Thr Ile Thr Glu Gly Ser Trp Pro Leu 100 105 110	
	Thr Pro Ala Gly Ala Gln Glu Ala Leu Gly Ser Gln Met Gly Trp Thr 115 120 125	
	Gly Met Leu Ser Ala Leu Lys Ala Trp Leu Glu Tyr Gly Val Asn Leu 130 135 140	
	Arg Asp Gly Phe Tyr Lys Gln 145 150	
	<210> 7 <211> 1335 <212> DNA <213> Corynebacterium glutamicum	

<220>		
<221>	CDS	
<222>	(151)..(1185)	
<223>	integrales Membranprotein (Permease) des ABC-Transporters mit der Aktivit 鋗 eines Trehalose-Importers	
<400>	7	
tacggagtga acctccgcga cgggttttat aagcaatagg caatgtgtcc atcacgatgt	60	
gtggcggatt atgatccatg taacaagaat gtgcagtttc acagaactga caatcaactt	120	
attttgacct gacaaaagga gcgacgacac atg gcc aca ttc aaa cag gcc aga	174	
Met Ala Thr Phe Lys Gln Ala Arg		
1 5		
agc gct gcc tgg ctg atc gcc ccc gcc ctc gtg gtc ctt gca gtg gtg	222	
Ser Ala Ala Trp Leu Ile Ala Pro Ala Leu Val Val Leu Ala Val Val		
10 15 20		
atc gga tat ccc atc gtc cga gca att tgg cta tcc ttc cag gcc gac	270	
Ile Gly Tyr Pro Ile Val Arg Ala Ile Trp Leu Ser Phe Gln Ala Asp		
25 30 35 40		
aaa ggc ctc gac ccc acc acc gga ctc ttc acc gac ggt ggc ttc gca	318	
Lys Gly Leu Asp Thr Thr Gly Leu Phe Thr Asp Gly Gly Phe Ala		
45 50 55		
gga cta gac aat tac ctc tac tgg ctc acc caa cga tgc atg ggt tca	366	
Gly Leu Asp Asn Tyr Leu Tyr Trp Thr Gln Arg Cys Met Gly Ser		
60 65 70		
gac ggc acc atc cgt acc tgc cca ccc ggc aca cta gcc acc gac ttc	414	
Asp Gly Thr Ile Arg Thr Cys Pro Gly Thr Leu Ala Thr Asp Phe		
75 80 85		
[0009] tgg cca gca cta cgc atc acg ttg ttc ttc acc gtg gtt acc gtc ggc	462	
Trp Pro Ala Leu Arg Ile Thr Leu Phe Phe Thr Val Val Thr Val Gly		
90 95 100		
ttg gaa act atc ctc ggc acc gcc atg gca ctg atc atg aac aaa gaa	510	
Leu Glu Thr Ile Leu Gly Thr Ala Met Ala Leu Ile Met Asn Lys Glu		
105 110 115 120		
ttc cgt ggc cgc gca ctt gtt cgc gca gcg att ctt atc cct tgg gca	558	
Phe Arg Gly Arg Leu Val Arg Ala Ala Ile Leu Ile Pro Trp Ala		
125 130 135		
atc ccc acc gcc gtc acc gca aaa ctg tgg cag ttc atc ttc gca cca	606	
Ile Pro Thr Ala Val Thr Ala Lys Leu Trp Gln Phe Ile Phe Ala Pro		
140 145 150		
caa ggc atc atc aac tcc atg ttt gga ctt agt gtc agt tgg acc acc	654	
Gln Gly Ile Ile Asn Ser Met Phe Gly Leu Ser Val Ser Trp Thr Thr		
155 160 165		
gat ccg tgg gca gct aga gcc gcc gtc att ctt gcc gac gtc tgg aaa	702	
Asp Pro Trp Ala Ala Arg Ala Ala Val Ile Leu Ala Asp Val Trp Lys		
170 175 180		
acc aca cca ttc atg gca ctg ctg atc ctc gcc ggt ctg caa atg atc	750	
Thr Thr Pro Phe Met Ala Leu Leu Ile Leu Ala Gly Leu Gln Met Ile		
185 190 195 200		
ccg aag gaa acc tac gaa gca gcc cgc gtc gat ggc gca acc gcg tgg	798	
Pro Lys Glu Thr Tyr Glu Ala Ala Arg Val Asp Gly Ala Thr Ala Trp		
205 210 215		
cag caa ttc acc aag atc acc ctc ccg ctg gtg cgc cca gct ttg atg	846	
Gln Gln Phe Thr Lys Ile Thr Leu Pro Leu Val Arg Pro Ala Leu Met		
220 225 230		
gtg gca gta ctc ttc cgc acc ctc gat gcg cta cgc atg tat gac ctc	894	

```

Val Ala Val Leu Phe Arg Thr Leu Asp Ala Leu Arg Met Tyr Asp Leu
    235                      240                      245
ccc gtc atc atg atc tcc agc tcc tcc aac tcc ccc acc gct gtt atc      942
Pro Val Ile Met Ile Ser Ser Ser Asn Ser Pro Thr Ala Val Ile
    250                      255                      260
tcc cag ctg gtt gtg gaa gac atg cgc caa aac aac ttc aac tcc gct      990
Ser Gln Leu Val Val Glu Asp Met Arg Gln Asn Asn Phe Asn Ser Ala
    265                      270                      275                      280
tcc gcc ctt tcc aca ctg atc ttc ctg ctg atc ttc ttc gtg gcg ttc      1038
Ser Ala Leu Ser Thr Leu Ile Phe Leu Ile Phe Phe Val Ala Phe
    285                      290                      295
atc atg atc cga ttc ctc ggc gca gat gtt tcg ggc caa cgc gga ata      1086
Ile Met Ile Arg Phe Leu Gly Ala Asp Val Ser Gly Gln Arg Gly Ile
    300                      305                      310
aag aaa aag aaa ctg ggc gga acc aag gat gag aaa ccc acc gct aag      1134
Lys Lys Lys Lys Leu Gly Gly Thr Lys Asp Glu Lys Pro Thr Ala Lys
    315                      320                      325
gat gct gtt gta aag gcc gat tct gct gtg aag gaa gcc gct aag cca      1182
Asp Ala Val Val Lys Ala Asp Ser Ala Val Lys Glu Ala Ala Lys Pro
    330                      335                      340
tga ctaaacgaac aaaaggactc atcctcaact acgccggagt ggtgttcac      1235
ctcttctggg gactagctcc cttctactgg atggttatca ccgcactgcg cgattccaag      1295
cacacctttg acaccacccc atggccaacg cacgtcacct      1335

```

[0010]

```

<210> 8
<211> 344
<212> PRT
<213> Corynebacterium glutamicum
<400> 8

```

```

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

```

Ala Ala Ile Leu Ile Pro Trp Ala Ile Pro Thr Ala Val Thr Ala Lys
 130 135 140

Leu Trp Gln Phe Ile Phe Ala Pro Gln Gly Ile Ile Asn Ser Met Phe
 145 150 155 160

Gly Leu Ser Val Ser Trp Thr Thr Asp Pro Trp Ala Ala Arg Ala Ala
 165 170 175

Val Ile Leu Ala Asp Val Trp Lys Thr Thr Pro Phe Met Ala Leu Leu
 180 185 190

Ile Leu Ala Gly Leu Gln Met Ile Pro Lys Glu Thr Tyr Glu Ala Ala
 195 200 205

Arg Val Asp Gly Ala Thr Ala Trp Gln Gln Phe Thr Lys Ile Thr Leu
 210 215 220

Pro Leu Val Arg Pro Ala Leu Met Val Ala Val Leu Phe Arg Thr Leu
 225 230 235 240

Asp Ala Leu Arg Met Tyr Asp Leu Pro Val Ile Met Ile Ser Ser Ser
 245 250 255

Ser Asn Ser Pro Thr Ala Val Ile Ser Gln Leu Val Val Glu Asp Met
 260 265 270

Arg Gln Asn Asn Phe Asn Ser Ala Ser Ala Leu Ser Thr Leu Ile Phe
 275 280 285

Leu Leu Ile Phe Phe Val Ala Phe Ile Met Ile Arg Phe Leu Gly Ala
 290 295 300

Asp Val Ser Gly Gln Arg Gly Ile Lys Lys Lys Lys Leu Gly Gly Thr
 305 310 315 320

Lys Asp Glu Lys Pro Thr Ala Lys Asp Ala Val Val Lys Ala Asp Ser
 325 330 335

Ala Val Lys Glu Ala Ala Lys Pro
 340

[0011]

<210> 9
 <211> 1137
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <221> CDS
 <222> (151)..(987)
 <223> integrales Membranprotein (Permease) des ABC-Transporters mit der Aktivit 鋗 eines Trehalose-Importers

<400> 9
 ggcggttcac atgatccgat tctcggcg agatgtttcg ggccaacgcg gaataaagaa 60

	aaagaaactg ggcggaacca aggatgagaa acccaccgct aaggatgctg ttgtaaaggc	120
	cgattctgct gtgaaggaag ccgctaagcc atg act aaa cga aca aaa gga ctc Met Thr Lys Arg Thr Lys Gly Leu 1 5	174
	atc ctc aac tac gcc gga gtg gtg ttc atc ctc ttc tgg gga cta gct Ile Leu Asn Tyr Ala Gly Val Val Phe Ile Leu Phe Trp Gly Leu Ala 10 15 20	222
	ccc ttc tac tgg atg gtt atc acc gca ctg cgc gat tcc aag cac acc Pro Phe Tyr Trp Met Val Ile Thr Ala Leu Arg Asp Ser Lys His Thr 25 30 35 40	270
	ttt gac acc acc cca tgg cca acg cac gtc acc ttg gat aac ttc cgg Phe Asp Thr Thr Pro Trp Pro Thr His Val Thr Leu Asp Asn Phe Arg 45 50 55	318
	gac gca ctg gcc acc gac aaa ggc aac aac ttc ctc gca gcc att ggc Asp Ala Leu Ala Thr Asp Lys Gly Asn Asn Phe Leu Ala Ala Ile Gly 60 65 70	366
	aac tca ctg gtc atc agc gtc acc aca aca gcg atc gct gtt ctc gtg Asn Ser Leu Val Ile Ser Val Thr Thr Thr Ala Ile Ala Val Leu Val 75 80 85	414
	gga gtg ttc acc gcc tac gct cta gcc cga ctg gaa ttc ccg ggc aaa Gly Val Phe Thr Ala Tyr Ala Leu Ala Arg Leu Glu Phe Pro Gly Lys 90 95 100	462
	ggc att gtc acc ggc atc atc ttg gca gcc tcc atg ttc ccc ggc atc Gly Ile Val Thr Gly Ile Ile Leu Ala Ala Ser Met Phe Pro Gly Ile 105 110 115 120	510
[0012]	gcc ctg gtc act ccg ctg ttc cag ctc ttc ggt gac ctc aac tgg atc Ala Leu Val Thr Pro Leu Phe Gln Leu Phe Gly Asp Leu Asn Trp Ile 125 130 135	558
	ggc acc tac caa gcg ctg att atc ccg aac att tcc ttc gcg cta cct Gly Thr Tyr Gln Ala Leu Ile Ile Pro Asn Ile Ser Phe Ala Leu Pro 140 145 150	606
	ctg acg atc tac acg ctc gta tcc ttc ttc agg caa ctg ccc tgg gaa Leu Thr Ile Tyr Thr Leu Val Ser Phe Phe Arg Gln Leu Pro Trp Glu 155 160 165	654
	ctc gaa gaa tca gca cgt gtc gac ggc gcc aca cgt ggc caa gcc ttc Leu Glu Glu Ser Ala Arg Val Asp Gly Ala Thr Arg Gly Gln Ala Phe 170 175 180	702
	cgc atg atc ctg ctt cct cta gca gcg ccc gca cta ttt acc acc gcg Arg Met Ile Leu Leu Pro Leu Ala Ala Pro Ala Leu Phe Thr Thr Ala 185 190 195 200	750
	atc ctc gca ttc att gca acg tgg aac gaa ttc atg ctg gcc cgc caa Ile Leu Ala Phe Ile Ala Thr Trp Asn Glu Phe Met Leu Ala Arg Gln 205 210 215	798
	cta tcc aac acc tcc aca gag cca gtg acc gtt gcg atc gca agg ttc Leu Ser Asn Thr Ser Thr Glu Pro Val Thr Val Ala Ile Ala Arg Phe 220 225 230	846
	acc gga cca agc tcc ttc gaa tac ccc tac gcc tct gtc atg gca gcg Thr Gly Pro Ser Ser Phe Glu Tyr Pro Tyr Ala Ser Val Met Ala Ala 235 240 245	894
	gga gct ttg gtg acc atc cca ctg atc atc atg gtt ctc atc ttc caa Gly Ala Leu Val Thr Ile Pro Leu Ile Ile Met Val Leu Ile Phe Gln 250 255 260	942
	cgc cgc atc gtc tcc gga ctc acc gca ggt ggc gtg aaa gcc tag Arg Arg Ile Val Ser Gly Leu Thr Ala Gly Gly Val Lys Ala	987

265	270	275	
actagatact catgagtgt gataaatccc aggaccaatc cgaatcgcaa cgcaaagggc			1047
ttcaaccgga agcgctgctt ggattcctgg gattttcttc attcctcgcc gtcattcagg			1107
cagtcataca cgtgttacgc cccgaacctg			1137
<210> 10			
<211> 278			
<212> PRT			
<213> Corynebacterium glutamicum			
<400> 10			
Met Thr Lys Arg Thr Lys Gly Leu Ile Leu Asn Tyr Ala Gly Val Val			
1 5 10 15			
Phe Ile Leu Phe Trp Gly Leu Ala Pro Phe Tyr Trp Met Val Ile Thr			
20 25 30			
Ala Leu Arg Asp Ser Lys His Thr Phe Asp Thr Thr Pro Trp Pro Thr			
35 40 45			
His Val Thr Leu Asp Asn Phe Arg Asp Ala Leu Ala Thr Asp Lys Gly			
50 55 60			
Asn Asn Phe Leu Ala Ala Ile Gly Asn Ser Leu Val Ile Ser Val Thr			
65 70 75 80			
Thr Thr Ala Ile Ala Val Leu Val Gly Val Phe Thr Ala Tyr Ala Leu			
85 90 95			
Ala Arg Leu Glu Phe Pro Gly Lys Gly Ile Val Thr Gly Ile Ile Leu			
100 105 110			
Ala Ala Ser Met Phe Pro Gly Ile Ala Leu Val Thr Pro Leu Phe Gln			
115 120 125			
Leu Phe Gly Asp Leu Asn Trp Ile Gly Thr Tyr Gln Ala Leu Ile Ile			
130 135 140			
Pro Asn Ile Ser Phe Ala Leu Pro Leu Thr Ile Tyr Thr Leu Val Ser			
145 150 155 160			
Phe Phe Arg Gln Leu Pro Trp Glu Leu Glu Glu Ser Ala Arg Val Asp			
165 170 175			
Gly Ala Thr Arg Gly Gln Ala Phe Arg Met Ile Leu Leu Pro Leu Ala			
180 185 190			
Ala Pro Ala Leu Phe Thr Thr Ala Ile Leu Ala Phe Ile Ala Thr Trp			
195 200 205			
Asn Glu Phe Met Leu Ala Arg Gln Leu Ser Asn Thr Ser Thr Glu Pro			
210 215 220			

[0013]

Val Thr Val Ala Ile Ala Arg Phe Thr Gly Pro Ser Ser Phe Glu Tyr
 225 230 235 240

Pro Tyr Ala Ser Val Met Ala Ala Gly Ala Leu Val Thr Ile Pro Leu
 245 250 255

Ile Ile Met Val Leu Ile Phe Gln Arg Arg Ile Val Ser Gly Leu Thr
 260 265 270

Ala Gly Gly Val Lys Ala
 275

<210> 11
 <211> 525
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <221> CDS
 <222> (151)..(375)
 <223> hypothetisches Protein

[0014]

<400> 11
 cggaccaagc tccttcgaat acccctacgc ctctgtcatg gcagcgggag ctttggtagac 60
 catcccaactg atcatcatgg ttctcatett ccaacgccgc atcgtctcgc gactcaccgc 120
 aggtggcgtg aaagcctaga ctagatactc atg agt gct gat aaa tcc cag gac 174
 Met Ser Ala Asp Lys Ser Gln Asp
 1 5

caa tcc gaa tcg caa cgc aaa ggg ctt caa ccc gaa gcg ctg ctt gga 222
 Gln Ser Glu Ser Gln Arg Lys Gly Leu Gln Pro Glu Ala Leu Leu Gly
 10 15 20

ttc ctg gga ttt ttc tca ttc ctc gcc gtc atc cag gca gtc atc aac 270
 Phe Leu Gly Phe Phe Ser Phe Leu Ala Val Ile Gln Ala Val Ile Asn
 25 30 35 40

gtg tta cgc ccc gaa cct gcc gtg tgg cca gct ctt ctc gcg ctc gtt 318
 Val Leu Arg Pro Glu Pro Ala Val Trp Pro Ala Leu Leu Ala Leu Val
 45 50 55

tta gta atc gcc aca gtg tca gta tgg agg gct tgg cga aag cgc cgc 366
 Leu Val Ile Ala Thr Val Ser Val Trp Arg Ala Trp Arg Lys Arg Arg
 60 65 70

cct aat taa agttcctgcg ccaacgccac gataattcca gatggcccgc 415
 Pro Asn

gcagataaca caatcggtag gtgtcctcgt aatttgcgat cccatctagt ggttccgcac 475
 cgatatgttc gatcgtttcc tcaatatcat ccaccgcaaa catcaaacgg 525

<210> 12
 <211> 74
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 12
 Met Ser Ala Asp Lys Ser Gln Asp Gln Ser Glu Ser Gln Arg Lys Gly
 1 5 10 15

Leu Gln Pro Glu Ala Leu Leu Gly Phe Leu Gly Phe Phe Ser Phe Leu
 20 25 30

Ala Val Ile Gln Ala Val Ile Asn Val Leu Arg Pro Glu Pro Ala Val
 35 40 45

Trp Pro Ala Leu Leu Ala Leu Val Leu Val Ile Ala Thr Val Ser Val
 50 55 60

Trp Arg Ala Trp Arg Lys Arg Arg Pro Asn
 65 70

<210> 13
 <211> 1305
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium efficiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (151)..(1152)
 <223> ATP-bindendes und -hydrolysierendes (ATPase) Protein des
 ABC-Transporters mit der Aktivit 鏰 eines Trehalose-Importers

<400> 13
 atgggggggt cgcggtggt ggttgccggg atggtggata cccagcgtct ggatcagatc 60
 gcgaccgcgg agaaggtcac cgcacgggtc tgagaatgtg gccggccac aggtacacaa 120
 ctgggtgtga cactgctaac ttcataaggtt atg gcc act gtt tcc ttt gac aaa 174
 Met Ala Thr Val Ser Phe Asp Lys
 1 5

gtc tcc atc cgg tac ccc ggt gcg gag cgc ccc acc gtc cat gag ctc 222
 Val Ser Ile Arg Tyr Pro Gly Ala Glu Arg Pro Thr Val His Glu Leu
 10 15 20

gac ctc gag ata gcc gac ggt gaa ttc ctc gta ctc gtc ggc ccg tcg 270
 Asp Leu Glu Ile Ala Asp Gly Glu Phe Leu Val Leu Val Gly Pro Ser
 25 30 35 40

ggg tgt gga aaa tca acc acg ctg cga gcg ctc gcc ggg ctc gag gag 318
 Gly Cys Gly Lys Ser Thr Thr Leu Arg Ala Leu Ala Gly Leu Glu Glu
 45 50 55

gtc gaa tcc ggt gtg atc cgc atc gac ggg cag gat gtc acc agt cag 366
 Val Glu Ser Gly Val Ile Arg Ile Asp Gly Gln Asp Val Thr Ser Gln
 60 65 70

gaa cct gcg gag cgt gac atc gcg atg gtg ttc cag aac tac gcc ctc 414
 Glu Pro Ala Glu Arg Asp Ile Ala Met Val Phe Gln Asn Tyr Ala Leu
 75 80 85

tac ccc cac atg tcc gtg gcg cgg aat atg ggt ttc gcc ctc aaa ctg 462
 Tyr Pro His Met Ser Val Ala Arg Asn Met Gly Phe Ala Leu Lys Leu
 90 95 100

gcc aaa ctg ccc cag gcg gag atc gac gcc aag gtc cgg gag gcc gcc 510
 Ala Lys Leu Pro Gln Ala Glu Ile Asp Ala Lys Val Arg Glu Ala Ala
 105 110 115 120

gag atc ctc ggc ctc acc gac tac ctg gac cgc aaa ccg aag gac ctc 558
 Glu Ile Leu Gly Leu Thr Asp Tyr Leu Asp Arg Lys Pro Lys Asp Leu
 125 130 135

tcc ggt ggt cag cgc cag cgt gtg gcc atg ggc cgg gcc ctg gtg cgc 606
 Ser Gly Gly Gln Arg Gln Arg Val Ala Met Gly Arg Ala Leu Val Arg
 140 145 150

[0015]

	aac ccg aag gtc ttc ctc atg gat gag ccc ctg tcc aac ctc gat gcc Asn Pro Lys Val Phe Leu Met Asp Glu Pro Leu Ser Asn Leu Asp Ala 155 160 165	654
	aaa ctg cgt gtg cag acg cgc gcg gaa gtt gcc gca ctg cag cgt cgc Lys Leu Arg Val Gln Thr Arg Ala Glu Val Ala Leu Gln Arg Arg 170 175 180	702
	ctg ggt acc acc acc gtc tat gtc acc cat gat cag gtg gag gcc atg Leu Gly Thr Thr Thr Val Tyr Val Thr His Asp Gln Val Glu Ala Met 185 190 195 200	750
	acg atg ggc gac cgc gtc gcg gtg ctc aag gac gga ctg ctc cag cag Thr Met Gly Asp Arg Val Ala Val Leu Lys Asp Gly Leu Leu Gln Gln 205 210 215	798
	gtg gcc cca ccc cgg gag ctc tac gac acc ccg gtc aat gcg ttc gtc Val Ala Pro Pro Arg Glu Leu Tyr Asp Thr Pro Val Asn Ala Phe Val 220 225 230	846
	gcc ggt ttc atc ggc tcc cca tcg atg aat ctc ttc ccc tac gac ggt Ala Gly Phe Ile Gly Ser Pro Ser Met Asn Leu Phe Pro Tyr Asp Gly 235 240 245	894
	gtg acc ctg ggt gtg cgt ccg gaa tcc atg ctg gtg gtc acc ggc gag Val Thr Leu Gly Val Arg Pro Glu Ser Met Leu Val Val Thr Gly Glu 250 255 260	942
	gcc ccg gcc ggt tac acc gtg gtg gac ggg acg gtg gac atc gtc gag Ala Pro Ala Gly Tyr Thr Val Val Asp Gly Thr Val Asp Ile Val Glu 265 270 275 280	990
	gag ctc ggt tcc gag tcc tat gtt tac gcc acc tgc gac ggc aac cgc Glu Leu Gly Ser Glu Ser Tyr Val Tyr Ala Thr Cys Asp Gly Asn Arg 285 290 295	1038
[0016]	ctg gtg gcg cgc tgg gag gac gcc gtg gtg ccc gcg ccg ggt gac cgg Leu Val Ala Arg Trp Glu Asp Ala Val Val Pro Ala Pro Gly Asp Arg 300 305 310	1086
	gtg cgg ttc gcc ttc gac ccg gcg ggt tca cac cgt ttc gac ccg acc Val Arg Phe Ala Phe Asp Pro Ala Gly Ser His Arg Phe Asp Pro Thr 315 320 325	1134
	agc ggt tac cgg ctc agc tgagggtgac cacggtgggg gtcgcggcgt Ser Gly Tyr Arg Leu Ser 330	1182
	cgtaagcac tgccccggc acgggggtga tttagagtaa accggtgcgg gaaagtggcg	1242
	aaagtcatta gattgaagtc acctgttgca gagaaagggtg acccaccatg tccaagtttt	1302
	ccc	1305
	<210> 14 <211> 334 <212> PRT <213> Corynebacterium efficiens	
	<400> 14	
	Met Ala Thr Val Ser Phe Asp Lys Val Ser Ile Arg Tyr Pro Gly Ala 1 5 10 15	
	Glu Arg Pro Thr Val His Glu Leu Asp Leu Glu Ile Ala Asp Gly Glu 20 25 30	
	Phe Leu Val Leu Val Gly Pro Ser Gly Cys Gly Lys Ser Thr Thr Leu	

35 40 45

Arg Ala Leu Ala Gly Leu Glu Glu Val Glu Ser Gly Val Ile Arg Ile
 50 55 60

Asp Gly Gln Asp Val Thr Ser Gln Glu Pro Ala Glu Arg Asp Ile Ala
 65 70 75 80

Met Val Phe Gln Asn Tyr Ala Leu Tyr Pro His Met Ser Val Ala Arg
 85 90 95

Asn Met Gly Phe Ala Leu Lys Leu Ala Lys Leu Pro Gln Ala Glu Ile
 100 105 110

Asp Ala Lys Val Arg Glu Ala Ala Glu Ile Leu Gly Leu Thr Asp Tyr
 115 120 125

Leu Asp Arg Lys Pro Lys Asp Leu Ser Gly Gly Gln Arg Gln Arg Val
 130 135 140

Ala Met Gly Arg Ala Leu Val Arg Asn Pro Lys Val Phe Leu Met Asp
 145 150 155 160

Glu Pro Leu Ser Asn Leu Asp Ala Lys Leu Arg Val Gln Thr Arg Ala
 165 170 175

[0017] Glu Val Ala Ala Leu Gln Arg Arg Leu Gly Thr Thr Thr Val Tyr Val
 180 185 190

Thr His Asp Gln Val Glu Ala Met Thr Met Gly Asp Arg Val Ala Val
 195 200 205

Leu Lys Asp Gly Leu Leu Gln Gln Val Ala Pro Pro Arg Glu Leu Tyr
 210 215 220

Asp Thr Pro Val Asn Ala Phe Val Ala Gly Phe Ile Gly Ser Pro Ser
 225 230 235 240

Met Asn Leu Phe Pro Tyr Asp Gly Val Thr Leu Gly Val Arg Pro Glu
 245 250 255

Ser Met Leu Val Val Thr Gly Glu Ala Pro Ala Gly Tyr Thr Val Val
 260 265 270

Asp Gly Thr Val Asp Ile Val Glu Glu Leu Gly Ser Glu Ser Tyr Val
 275 280 285

Tyr Ala Thr Cys Asp Gly Asn Arg Leu Val Ala Arg Trp Glu Asp Ala
 290 295 300

Val Val Pro Ala Pro Gly Asp Arg Val Arg Phe Ala Phe Asp Pro Ala
 305 310 315 320

Gly Ser His Arg Phe Asp Pro Thr Ser Gly Tyr Arg Leu Ser

	325	330
<210>	15	
<211>	1605	
<212>	DNA	
<213>	Corynebacterium efficiens	
<220>		
<221>	CDS	
<222>	(151)..(1455)	
<223>	periplasmatisches (oder Lipoprotein) Substrat-bindendes Protein des ABC-Transporters mit der Aktivit 經 eines Trehalose-Importers	
<400>	15	
	ttaccggtc agctgagggt gaccacggtg ggggtcgcgg cgtcgtcaag cactgcccc	60
	ggcaccgggg tgatttgagg taaaccggtg cgggaaagtg gcgaaagtca ttagattgaa	120
	gtcacctgtt gcagagaaag gtgacccacc atg tcc aag ttt tcc cgc aag acc	174
	Met Ser Lys Phe Ser Arg Lys Thr	
	1 5	
	ggc gta tcg ctg gcc gca acc agc ctg atc gcc gcc atc gcc ctg gcc	222
	Gly Val Ser Leu Ala Ala Thr Ser Leu Ile Ala Ala Ile Ala Leu Ala	
	10 15 20	
	ggt tgt ggc aat gac acc gcc gac gat gcc ggc acg acc gac acc agc	270
	Gly Cys Gly Asn Asp Thr Ala Asp Asp Ala Gly Thr Thr Asp Thr Ser	
	25 30 35 40	
	acc aat gac acc gaa gcc acc acc gcc gcc tcg ggt gag gag gcc cgc	318
	Thr Asn Asp Thr Ala Thr Thr Ala Ser Gly Glu Glu Gly Arg	
	45 50 55	
[0018]	ggc ccg att acc ttc gcc atg ggc aag aac gac acc gac aag atc att	366
	Gly Pro Ile Thr Phe Ala Met Gly Lys Asn Asp Thr Asp Lys Ile Ile	
	60 65 70	
	ccc gtg atc gag aag tgg aac gag gag aac ccc gac cag gag gtg acc	414
	Pro Val Ile Glu Lys Trp Asn Glu Glu Asn Pro Asp Gln Glu Val Thr	
	75 80 85	
	ctc aac gaa ctc gcc ggt gag gcc gac gcc cag cgc gag acc ctc gtg	462
	Leu Asn Glu Leu Ala Gly Glu Ala Asp Ala Gln Arg Glu Thr Leu Val	
	90 95 100	
	cag tcc ctc cag gcc ggc aac tcc gat tat gac gtc atg gcc ctc gat	510
	Gln Ser Leu Gln Ala Gly Asn Ser Asp Tyr Asp Val Met Ala Leu Asp	
	105 110 115 120	
	gtc atc tgg acc gcc gac ttc gcc gcc aac cag tgg ctc gcg ccg ctt	558
	Val Ile Trp Thr Ala Asp Phe Ala Ala Asn Gln Trp Leu Ala Pro Leu	
	125 130 135	
	gag ggg gaa ctc gag gtc gac acc tcc ggg ctg ctt gag gcc acc gtg	606
	Glu Gly Glu Leu Glu Val Asp Thr Ser Gly Leu Leu Glu Ala Thr Val	
	140 145 150	
	gaa tcc gcc aca tac atg gac acc ctc tac gca ctg ccg cag aac acc	654
	Glu Ser Ala Thr Tyr Met Asp Thr Leu Tyr Ala Leu Pro Gln Asn Thr	
	155 160 165	
	aac ggc cag ctg ctc tac cgc aac acc gag atc atc ccc gag gcc ccg	702
	Asn Gly Gln Leu Leu Tyr Arg Asn Thr Glu Ile Ile Pro Glu Ala Pro	
	170 175 180	
	gag aac tgg gct gac ctc gtc gaa tcc tgc acc ctg gcg gag gag gcc	750
	Glu Asn Trp Ala Asp Leu Val Glu Ser Cys Thr Leu Ala Glu Glu Ala	
	185 190 195 200	

	gag gtt gac tgc ctg acc acc cag ctc aag cag tac gag ggc ctg acc Glu Val Asp Cys Leu Thr Thr Gln Leu Lys Gln Tyr Glu Gly Leu Thr 205 210 215	798
	gtc aac acc atc ggc ttc atg gag ggc tgg ggc ggt tcc gtc ctg gac Val Asn Thr Ile Gly Phe Met Glu Gly Trp Gly Gly Ser Val Leu Asp 220 225 230	846
	gat gac ggc acc acc gtg gtc gtc gac tcc gac gag tcg aag gag ggc Asp Asp Gly Thr Thr Val Val Val Asp Ser Asp Glu Ser Lys Glu Gly 235 240 245	894
	ctg cag gcg ctt gtc gac gcc tac gag gac ggc acc atc tcg tcc gcg Leu Gln Ala Leu Val Asp Ala Tyr Glu Asp Gly Thr Ile Ser Ser Ala 250 255 260	942
	tcc acc gca gcc acc gag gag gag acc aac ctg gcc ttc acc gcc ggt Ser Thr Ala Ala Thr Glu Glu Glu Thr Asn Leu Ala Phe Thr Ala Gly 265 270 275 280	990
	gag acc gcc tac gcc atc aac tgg ccg tac atg tac acc aac gcc gag Glu Thr Ala Tyr Ala Ile Asn Trp Pro Tyr Met Tyr Thr Asn Ala Glu 285 290 295	1038
	gac tcc gag gcc acc gcc ggc aag ttc gag gtc cag cca ctc gtg ggc Asp Ser Glu Ala Thr Ala Gly Lys Phe Glu Val Gln Pro Leu Val Gly 300 305 310	1086
	aag gac ggc gtg ggt gtg tcc acc ctc ggt ggc tac aac aac gcc atc Lys Asp Gly Val Gly Val Ser Thr Leu Gly Gly Tyr Asn Asn Ala Ile 315 320 325	1134
	aac atc aac tcg gag aac aag gca acc gcc cgc gac ttc atc gag ttc Asn Ile Asn Ser Glu Asn Lys Ala Thr Ala Arg Asp Phe Ile Glu Phe 330 335 340	1182
[0019]	atc atc aac gag gag aac cag acc tgg ttc gcc gac aac tcc ttc cca Ile Ile Asn Glu Glu Asn Gln Thr Trp Phe Ala Asp Asn Ser Phe Pro 345 350 355 360	1230
	ccg gtg ctc gcc tcc atc tac gac gat gag gaa ctg atc gag cag tac Pro Val Leu Ala Ser Ile Tyr Asp Asp Glu Glu Leu Ile Glu Gln Tyr 365 370 375	1278
	cca tac ctg ccc gcg ctg aag gaa tcc ctg gag aac gcg gca ccg cgt Pro Tyr Leu Pro Ala Leu Lys Glu Ser Leu Glu Asn Ala Ala Pro Arg 380 385 390	1326
	ccg gtc tcc ccg ttc tac acc gcc atc tcc aag gcc atc cag gac aac Pro Val Ser Pro Phe Tyr Thr Ala Ile Ser Lys Ala Ile Gln Asp Asn 395 400 405	1374
	gcc tac gca gcc atc aac ggc aac gtc gac gtc gac cag gcc acc gct Ala Tyr Ala Ala Ile Asn Gly Asn Val Asp Val Asp Gln Ala Thr Ala 410 415 420	1422
	gac atg aag gca gca atc gag aac gcc tcc tag agcgacaggg acacccccac Asp Met Lys Ala Ala Ile Glu Asn Ala Ser 425 430	1475
	cccatgacac tccggtcacc caccaggtga ccggggtttt gtcatagtct gggcggaac	1535
	aggtgttgtc acccaactgc tttcccagtg tcggatcacg tgtctgtca agtgtcggat	1595
	ccaacgtccc	1605
	<210> 16	
	<211> 434	
	<212> PRT	
	<213> Corynebacterium efficiens	

<400> 16

Met Ser Lys Phe Ser Arg Lys Thr Gly Val Ser Leu Ala Ala Thr Ser
1 5 10 15

Leu Ile Ala Ala Ile Ala Leu Ala Gly Cys Gly Asn Asp Thr Ala Asp
20 25 30

Asp Ala Gly Thr Thr Asp Thr Ser Thr Asn Asp Thr Glu Ala Thr Thr
35 40 45

Ala Ala Ser Gly Glu Glu Gly Arg Gly Pro Ile Thr Phe Ala Met Gly
50 55 60

Lys Asn Asp Thr Asp Lys Ile Ile Pro Val Ile Glu Lys Trp Asn Glu
65 70 75 80

Glu Asn Pro Asp Gln Glu Val Thr Leu Asn Glu Leu Ala Gly Glu Ala
85 90 95

Asp Ala Gln Arg Glu Thr Leu Val Gln Ser Leu Gln Ala Gly Asn Ser
100 105 110

Asp Tyr Asp Val Met Ala Leu Asp Val Ile Trp Thr Ala Asp Phe Ala
115 120 125

[0020] Ala Asn Gln Trp Leu Ala Pro Leu Glu Gly Glu Leu Glu Val Asp Thr
130 135 140

Ser Gly Leu Leu Glu Ala Thr Val Glu Ser Ala Thr Tyr Met Asp Thr
145 150 155 160

Leu Tyr Ala Leu Pro Gln Asn Thr Asn Gly Gln Leu Leu Tyr Arg Asn
165 170 175

Thr Glu Ile Ile Pro Glu Ala Pro Glu Asn Trp Ala Asp Leu Val Glu
180 185 190

Ser Cys Thr Leu Ala Glu Glu Ala Glu Val Asp Cys Leu Thr Thr Gln
195 200 205

Leu Lys Gln Tyr Glu Gly Leu Thr Val Asn Thr Ile Gly Phe Met Glu
210 215 220

Gly Trp Gly Gly Ser Val Leu Asp Asp Asp Gly Thr Thr Val Val Val
225 230 235 240

Asp Ser Asp Glu Ser Lys Glu Gly Leu Gln Ala Leu Val Asp Ala Tyr
245 250 255

Glu Asp Gly Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Ala Ala Thr Glu Glu Glu
260 265 270

Thr Asn Leu Ala Phe Thr Ala Gly Glu Thr Ala Tyr Ala Ile Asn Trp
275 280 285

Pro Tyr Met Tyr Thr Asn Ala Glu Asp Ser Glu Ala Thr Ala Gly Lys
 290 295 300

Phe Glu Val Gln Pro Leu Val Gly Lys Asp Gly Val Gly Val Ser Thr
 305 310 315 320

Leu Gly Gly Tyr Asn Asn Ala Ile Asn Ile Asn Ser Glu Asn Lys Ala
 325 330 335

Thr Ala Arg Asp Phe Ile Glu Phe Ile Ile Asn Glu Glu Asn Gln Thr
 340 345 350

Trp Phe Ala Asp Asn Ser Phe Pro Pro Val Leu Ala Ser Ile Tyr Asp
 355 360 365

Asp Glu Glu Leu Ile Glu Gln Tyr Pro Tyr Leu Pro Ala Leu Lys Glu
 370 375 380

Ser Leu Glu Asn Ala Ala Pro Arg Pro Val Ser Pro Phe Tyr Thr Ala
 385 390 395 400

Ile Ser Lys Ala Ile Gln Asp Asn Ala Tyr Ala Ala Ile Asn Gly Asn
 405 410 415

Val Asp Val Asp Gln Ala Thr Ala Asp Met Lys Ala Ala Ile Glu Asn
 420 425 430

[0021]

Ala Ser

<210> 17
 <211> 786
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium efficiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (151)..(636)
 <223> Funktion unbekannt

<400> 17
 cccccacccc atgacactcc ggtcacccac caggtgaccg gggttttgtc atagtctggg 60
 cgggaacagg tgttgcacc caactgettt ccagtgctcg gatcacgtgt ctgctcaagt 120
 gtcggatcca acgtccctga ggaggacccc atg tca cac cag cgc tcc ccc gag 174
 Met Ser His Gln Arg Ser Pro Glu
 1 5
 aca ccc gag atg ctg tcc tac acc atc tcc gga ttc atc tcc cgg tgc 222
 Thr Pro Glu Met Leu Ser Tyr Thr Ile Ser Gly Phe Ile Ser Arg Cys
 10 15 20
 ccc gtc cag gtc tat gag gcc atc gtc gat cac cgt caa ctc tcc cga 270
 Pro Val Gln Val Tyr Glu Ala Ile Val Asp His Arg Gln Leu Ser Arg
 25 30 35 40
 cat ttc gcc acc ggc ggg gca cag ggc agg atg agc gcc ggc gcg acg 318
 His Phe Ala Thr Gly Gly Ala Gln Gly Arg Met Ser Ala Gly Ala Thr

																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						</
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

Lys Leu Thr Ile Thr Glu Ser Gly Trp Pro Pro Thr Thr Ala Gly Thr
115 120 125

Arg Lys Ala Leu Arg Glu Cys His Arg Trp Thr Thr Met Leu Thr Gly
130 135 140

Leu Lys Ala Trp Leu Glu His Gly Val Val Leu Gly Arg Asp Leu His
145 150 155 160

Arg

<210> 19
<211> 1347
<212> DNA
<213> Corynebacterium efficiens

<220>
<221> CDS
<222> (151)..(1197)
<223> integrales Membranprotein (Permease) des ABC-Transporters mit der Aktivität eines Trehalose-Importers

<400> 19
agggagcctt gttaaccgga gtagagggt ggaacggagg tggggttact gttccctcac 60
tgacaccagg gttctatgat ccaagtaaca cttttcctga tttctcttct tttcccatcc 120
atccccctcta cccaaggag cactggtgac atg gcc aag atg aaa cag gcg cga 174
Met Ala Lys Met Lys Gln Ala Arg
1 5

[0023]

tca gcc gca tgg ttg atc gcg cca gcc atg att gtc ctg acg gtg gtg 222
Ser Ala Ala Trp Leu Ile Ala Pro Ala Met Ile Val Leu Thr Val Val
10 15 20

atc ggc tac ccc atc gtc cgt gcc gtc tgg ttg tcc ttc cag gcg gac 270
Ile Gly Tyr Pro Ile Val Arg Ala Val Trp Leu Ser Phe Gln Ala Asp
25 30 35 40

aag ggt ctc gat ccc acc acc ggg ttg ttc acc gac ggt ggt ttc gcc 318
Lys Gly Leu Asp Pro Thr Thr Gly Leu Phe Thr Asp Gly Gly Phe Ala
45 50 55

ggt ttc gac aat tac ctg tac tgg ctc acc caa cgc tgc atg tcc ccc 366
Gly Phe Asp Asn Tyr Leu Tyr Trp Leu Thr Gln Arg Cys Met Ser Pro
60 65 70

gac ggc acc gtg ggt acc tgt ccg ccc ggt acc ctg gcc acc gac ttc 414
Asp Gly Thr Val Gly Thr Cys Pro Pro Gly Thr Leu Ala Thr Asp Phe
75 80 85

tgg ccg gcc ctg cgc atc acc ctg ttc ttc acc gtg gtc acc gtc acc 462
Trp Pro Ala Leu Arg Ile Thr Leu Phe Phe Thr Val Val Thr Val Thr
90 95 100

ctg gag acc atc ctg ggt atg gtc atg gcc ctg atc atg agc aag gag 510
Leu Glu Thr Ile Leu Gly Met Val Met Ala Leu Ile Met Ser Lys Glu
105 110 115 120

ttc cgc ggc cgg gcc ctc gtc cgc gcc gcg gtc ctg atc ccg tgg gcg 558
Phe Arg Gly Arg Ala Leu Val Arg Ala Ala Val Leu Ile Pro Trp Ala
125 130 135

atc ccg acg gcg gtc acc gcg aag ctg tgg cag ttc ctg ttc gcc cca 606
Ile Pro Thr Ala Val Thr Ala Lys Leu Trp Gln Phe Leu Phe Ala Pro
140 145 150

	cgg ggc atc atc aat gaa ctc ttc gga ctc aat atc agc tgg acc acc	654
	Arg Gly Ile Ile Asn Glu Leu Phe Gly Leu Asn Ile Ser Trp Thr Thr	
	155 160 165	
	gat ccg tgg gcg gca cgc gcc gcg gtc atc ctc gcc gat gtc tgg aag	702
	Asp Pro Trp Ala Ala Arg Ala Ala Val Ile Leu Ala Asp Val Trp Lys	
	170 175 180	
	acc acc ccg ttc atg gcg ctg ctc atc ctc gcc ggg ctg cag atg atc	750
	Thr Thr Pro Phe Met Ala Leu Leu Ile Leu Ala Gly Leu Gln Met Ile	
	185 190 195 200	
	ccc aag ggc acc tat gag gcc gcc cgt gtg gac ggg gcc agc gcc tgg	798
	Pro Lys Gly Thr Tyr Glu Ala Ala Arg Val Asp Gly Ala Ser Ala Trp	
	205 210 215	
	cag cag ttc acc agg atc acc ctc ccc ctg gtc aaa ccg gcc ctg atg	846
	Gln Gln Phe Thr Arg Ile Thr Leu Pro Leu Val Lys Pro Ala Leu Met	
	220 225 230	
	gtc gcg gtg ctg ttc cgc acc ctg gat gcc ctg cgc atg tac gac ctg	894
	Val Ala Val Leu Phe Arg Thr Leu Asp Ala Leu Arg Met Tyr Asp Leu	
	235 240 245	
	ccg gtg atc atg atc tcc gcc tcc tcg aac tcc ccc acc gcc gtg atc	942
	Pro Val Ile Met Ile Ser Ala Ser Ser Asn Ser Pro Thr Ala Val Ile	
	250 255 260	
	tcc cag ctg gtg gtc gag gac atg cgt cag aac aac ttc aac tcg gcc	990
	Ser Gln Leu Val Val Glu Asp Met Arg Gln Asn Asn Phe Asn Ser Ala	
	265 270 275 280	
	tcc gcg ctg tcg acg ttg atc ttc ctg ctc atc ttc ttc gtg gcc ttc	1038
	Ser Ala Leu Ser Thr Leu Ile Phe Leu Leu Ile Phe Phe Val Ala Phe	
	285 290 295	
[0024]	gtc atg atc cgg ttc ctc ggg gcg gat gtt tcc ggg cag cgc gga acg	1086
	Val Met Ile Arg Phe Leu Gly Ala Asp Val Ser Gly Gln Arg Gly Thr	
	300 305 310	
	gag aag aac agg cgg cgg tgg cgc agg ccc ggc cgg aag ggc gcg gct	1134
	Glu Lys Asn Arg Arg Arg Trp Arg Arg Pro Gly Arg Lys Gly Ala Ala	
	315 320 325	
	gtt gcc ggg gca ggc gtc ggc atc acc ggt gcc gcg gtg gca agt gag	1182
	Val Ala Gly Ala Gly Val Gly Ile Thr Gly Ala Ala Val Ala Ser Glu	
	330 335 340	
	gtg gca tca tca tga aacgcaagac caagaaccta atcctcaact acgcaggcgt	1237
	Val Ala Ser Ser	
	345	
	gggtgttcac cgtttctggg ggctggcgcc gttctactgg atggtgggtca ctgcactgcg	1297
	ggattcccg caccaccttcg acaccacccc ctggcccacg cacgtgaccc	1347
	<210> 20	
	<211> 348	
	<212> PRT	
	<213> Corynebacterium efficiens	
	<400> 20	
	Met Ala Lys Met Lys Gln Ala Arg Ser Ala Ala Trp Leu Ile Ala Pro	
	1 5 10 15	
	Ala Met Ile Val Leu Thr Val Val Ile Gly Tyr Pro Ile Val Arg Ala	
	20 25 30	

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

[0025]

	Arg Pro Gly Arg Lys Gly Ala Ala Val Ala Gly Ala Gly Val Gly Ile	
	325 330 335	
	Thr Gly Ala Ala Val Ala Ser Glu Val Ala Ser Ser	
	340 345	
	<210> 21	
	<211> 1137	
	<212> DNA	
	<213> Corynebacterium efficiens	
	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (151)..(987)	
	<223> integrales Membranprotein (Permease) des ABC-Transporters mit der Aktivit 鋗 eines Trehalose-Importers	
	<400> 21	
	gatccggttc ctcggggcgg atgtttccgg gcagcgcgga acggagaaga acaggcggcg	60
	gtggcgcagg cccggccgga agggcgcggc tgttgccggg gcaggcgtcg gcatcaccgg	120
	tgccgcggtg gcaagtgagg tggcatcatc atg aaa cgc aag acc aag aac cta	174
	Met Lys Arg Lys Thr Lys Asn Leu	
	1 5	
	atc ctc aac tac gca ggc gtg gtg ttc atc ctg ttc tgg ggg ctg gcg	222
	Ile Leu Asn Tyr Ala Gly Val Val Phe Ile Leu Phe Trp Gly Leu Ala	
	10 15 20	
	ccg ttc tac tgg atg gtg gtc act gca ctg cgg gat tcc cgc cac acc	270
	Pro Phe Tyr Trp Met Val Val Thr Ala Leu Arg Asp Ser Arg His Thr	
	25 30 35 40	
	ttc gac acc acc ccc tgg ccc acg cac gtg acc ctg cag aac ttc cgg	318
	Phe Asp Thr Thr Pro Trp Pro Thr His Val Thr Leu Gln Asn Phe Arg	
	45 50 55	
	gat gcg ctg gcc acc gac aag ggc aac aac ttc ctg gcg gcg atc ggc	366
	Asp Ala Leu Ala Thr Asp Lys Gly Asn Asn Phe Leu Ala Ala Ile Gly	
	60 65 70	
	aac tcg ctg atc gtc agt ctc acc acc acc gcc ctc gcg gtg atc gtg	414
	Asn Ser Leu Ile Val Ser Leu Thr Thr Ala Leu Ala Val Ile Val	
	75 80 85	
	ggc gtg ttc acc gcc tat gcg ctg gca cgc ctg gac ttc ccc ggt aag	462
	Gly Val Phe Thr Ala Tyr Ala Leu Ala Arg Leu Asp Phe Pro Gly Lys	
	90 95 100	
	ggg atc atc acc ggc atc atc ctg gcg gcc tcg atg ttc ccg ggt atc	510
	Gly Ile Ile Thr Gly Ile Ile Leu Ala Ala Ser Met Phe Pro Gly Ile	
	105 110 115 120	
	gcc ctg gtg acc ccg ctg ttc cag ctg ttc ggc aac atc ggc tgg atc	558
	Ala Leu Val Thr Pro Leu Phe Gln Leu Phe Gly Asn Ile Gly Trp Ile	
	125 130 135	
	ggc acc tac cag gcg ctg atc atc ccg aac atc tcc ttc gcc ctg ccg	606
	Gly Thr Tyr Gln Ala Leu Ile Ile Pro Asn Ile Ser Phe Ala Leu Pro	
	140 145 150	
	ctg acc atc tac acc ctg gtg tcc ttc ttc cgc cag ctg ccg tgg gag	654
	Leu Thr Ile Tyr Thr Leu Val Ser Phe Phe Arg Gln Leu Pro Trp Glu	
	155 160 165	
	ctc gag gag gcc gcc cgt gtg gac ggc gcg acc cgg ggg cag gcc ttc	702
	Leu Glu Glu Ala Ala Arg Val Asp Gly Ala Thr Arg Gly Gln Ala Phe	

[0026]

	170	175	180	
	cgc aag atc ctg tta ccc ctg gcc gcc ccg gcg ctg ttc acc acc gcg Arg Lys Ile Leu Leu Pro Leu Ala Ala Pro Ala Leu Phe Thr Thr Ala 185 190 195 200	750		
	atc ctg gcg ttc atc gcc tcg tgg aat gag ttc atg ctg gcc cgt cag Ile Leu Ala Phe Ile Ala Ser Trp Asn Glu Phe Met Leu Ala Arg Gln 205 210 215	798		
	ctg tcc acc acc gcc acc gaa ccg gtc acc gtg gcc atc gcc cgc ttc Leu Ser Thr Thr Ala Thr Glu Pro Val Thr Val Ala Ile Ala Arg Phe 220 225 230	846		
	tcc ggg ccg agt tcc ttc gag tac ccg tat gcc tcg gtg atg gca gcc Ser Gly Pro Ser Ser Phe Glu Tyr Pro Tyr Ala Ser Val Met Ala Ala 235 240 245	894		
	ggt gcc ctg gtc acc gtc cca ctg atc atc atg gtg ctc atc ttc cag Gly Ala Leu Val Thr Val Pro Leu Ile Ile Met Val Leu Ile Phe Gln 250 255 260	942		
	cga cgc atc gtc tcc gcc ctg acc gcg ggt ggt gtg aag gcc tag Arg Arg Ile Val Ser Gly Leu Thr Ala Gly Gly Val Lys Ala 265 270 275	987		
	actgtcggtc atgagcacga acgaacccag ggaccagtcc gaacacaaac gccgagccct	1047		
	ccagctcgat gcattcatcg ggttcctggg gttcttcgcc ttctgtcgg tgatccaggc	1107		
	cgtgatcaat gtgctccagc ccgaaccgaa	1137		
[0027]	<210> 22			
	<211> 278			
	<212> PRT			
	<213> Corynebacterium efficiens			
	<400> 22			
	Met Lys Arg Lys Thr Lys Asn Leu Ile Leu Asn Tyr Ala Gly Val Val 1 5 10 15			
	Phe Ile Leu Phe Trp Gly Leu Ala Pro Phe Tyr Trp Met Val Val Thr 20 25 30			
	Ala Leu Arg Asp Ser Arg His Thr Phe Asp Thr Thr Pro Trp Pro Thr 35 40 45			
	His Val Thr Leu Gln Asn Phe Arg Asp Ala Leu Ala Thr Asp Lys Gly 50 55 60			
	Asn Asn Phe Leu Ala Ala Ile Gly Asn Ser Leu Ile Val Ser Leu Thr 65 70 75 80			
	Thr Thr Ala Leu Ala Val Ile Val Gly Val Phe Thr Ala Tyr Ala Leu 85 90 95			
	Ala Arg Leu Asp Phe Pro Gly Lys Gly Ile Ile Thr Gly Ile Ile Leu 100 105 110			
	Ala Ala Ser Met Phe Pro Gly Ile Ala Leu Val Thr Pro Leu Phe Gln 115 120 125			

Leu Phe Gly Asn Ile Gly Trp Ile Gly Thr Tyr Gln Ala Leu Ile Ile
 130 135 140
 Pro Asn Ile Ser Phe Ala Leu Pro Leu Thr Ile Tyr Thr Leu Val Ser
 145 150 155 160
 Phe Phe Arg Gln Leu Pro Trp Glu Leu Glu Glu Ala Ala Arg Val Asp
 165 170 175
 Gly Ala Thr Arg Gly Gln Ala Phe Arg Lys Ile Leu Leu Pro Leu Ala
 180 185 190
 Ala Pro Ala Leu Phe Thr Thr Ala Ile Leu Ala Phe Ile Ala Ser Trp
 195 200 205
 Asn Glu Phe Met Leu Ala Arg Gln Leu Ser Thr Thr Ala Thr Glu Pro
 210 215 220
 Val Thr Val Ala Ile Ala Arg Phe Ser Gly Pro Ser Ser Phe Glu Tyr
 225 230 235 240
 Pro Tyr Ala Ser Val Met Ala Ala Gly Ala Leu Val Thr Val Pro Leu
 245 250 255
 Ile Ile Met Val Leu Ile Phe Gln Arg Arg Ile Val Ser Gly Leu Thr
 260 265 270
 [0028] Ala Gly Gly Val Lys Ala
 275

<210> 23
 <211> 534
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium efficiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (151)..(384)
 <223> hyopthetisches Protein

<400> 23
 ccgggccgag ttccttcgag taccggtatg cctcggtgat ggcagccggt gccctggtea 60
 ccgtcccact gatcatcatg gtgctcatct tccagcgacg catcgtctcc ggcctgaccg 120
 cgggtggtgt gaaggcctag actgtcggtc atg agc acg aac gaa ccc agg gac 174
 Met Ser Thr Asn Glu Pro Arg Asp
 1 5
 cag tcc gaa cac aaa cgc cga gcc ctc cag ctc gat gca ttc atc ggg 222
 Gln Ser Glu His Lys Arg Arg Ala Leu Gln Leu Asp Ala Phe Ile Gly
 10 15 20
 ttc ctg ggg ttc ttc gcc ttc ctg tgg gtg atc cag gcc gtg atc aat 270
 Phe Leu Gly Phe Phe Ala Phe Leu Ser Val Ile Gln Ala Val Ile Asn
 25 30 35 40
 gtg ctc cag ccc gaa ccg aag gtc tgg ccg gca ctg ctg gcc ctg ctg 318
 Val Leu Gln Pro Glu Pro Lys Val Trp Pro Ala Leu Leu Ala Leu Leu
 45 50 55

ctg gtg ctg gcg acg gtg agc ctg tgg cgg gcc cgg cgc gac cga tct 366
 Leu Val Leu Ala Thr Val Ser Leu Trp Arg Ala Arg Arg Asp Arg Ser
 60 65 70

ccc cgg acg ggg gct taa gcacccatgg ccatcgtcta caacgccgcc 414
 Pro Arg Thr Gly Ala
 75

accacggtca acggctttct cgcagatgac cgtgattccc tgcagtggct cttcgacgtc 474
 cccggatccg ccgagacgga agcggatata accacattcc tcgatatcgt cggcgctgta 534

<210> 24
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium efficiens

<400> 24

Met Ser Thr Asn Glu Pro Arg Asp Gln Ser Glu His Lys Arg Arg Ala
 1 5 10 15

Leu Gln Leu Asp Ala Phe Ile Gly Phe Leu Gly Phe Phe Ala Phe Leu
 20 25 30

Ser Val Ile Gln Ala Val Ile Asn Val Leu Gln Pro Glu Pro Lys Val
 35 40 45

Trp Pro Ala Leu Leu Ala Leu Leu Leu Val Leu Ala Thr Val Ser Leu
 50 55 60

[0029]

Trp Arg Ala Arg Arg Asp Arg Ser Pro Arg Thr Gly Ala
 65 70 75

<210> 25
 <211> 6199
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 25

gaaaattgtc ggcgcatca ttccggcgct ggcgtgaagt gcgatttggc acagctgata 60
 cgcatgaaa gccagcagca atcatccacg ggtatgccca cagtttgttt tcaggactgc 120
 gaccaggagt accactttcg caaggccgtg cgtcagtaga tatctagcgc tgaacaacgt 180
 agcgtggctg gtgagtgtg cactgctgtg cccaaggaac gtggcgatgc cattgtcggg 240
 atcttcattc agttcgtttt gggtagcag aacgggtccag tgggaaggc ttccgggata 300
 gacaagaagg aggagcactc cgccgatgag ctcaaataag ccgttgagtc ctttgagctt 360
 gatccgccc caaaagagtt gttgccaccg atcgcaact ttggcagtag ccatgcgttc 420
 tgctcctgac cttgaacagc ggtcccaatt tagaccgct aaaccacaa tgtgtactgg 480
 tgctgtaat ttagtagaac atggcaacgg tcacattcga caaggtcaca atccggtacc 540
 ccggcgcgga gcgcgaaca gttcatgagc ttgatttaga tatcgtgat ggcgagtttt 600
 tgggtgctgt cgcccttcg gttgttgta aatccactac gctgcgtgct ttggcggggc 660
 ttgaggcggt ggagtcgggt gtgatcaaaa ttgatggcaa ggatgtcact ggtcaggagc 720
 cggcgatcgc cgatatcgc atggtgttcc agaattatgc tctgtaccct cacatgacgg 780

	tggcgaagaa tatgggtttt gcgctgaagt tggctaagct gccgcaggcg cagatcgatg	840
	cgaaggtcaa tgaggctgcg gaaattcttg ggttgacgga gtttttgat cgcaagccta	900
	aggatttatc ggggtggtcag cgtcagcgtg tggcgatggg tcgcgcgttg gtgcgtgatc	960
	cgaaggtggt cctcatggat gagccgctgt ccaacctgga tgcgaaattg cgcgtgcaaa	1020
	cccgcgcgga ggtcgtgct ttgcagcgtc gcctgggcac caccacggtg tatgtcacc	1080
	acgatcaggt tgaggcaatg acgatggcg atcgggttgc ggtgctcaag gacgggttgc	1140
	tgcagcaggt cgcaccgccc agggagcttt acgacgccc ggtcaacgaa ttcgttcg	1200
	gcttcacggt ctcgccgtcc atgaacctct tccctgcaa cgggcacaag atgggtgtgc	1260
	gcccggagaa gatgctgtc aatgagacc ctgagggtt cacaagcatt gatgctgtg	1320
	tggatcgt cgaggagctt ggctccgaat cgtatgttta tgccacttg gagggccacc	1380
	gcctggtggc cgttgggtg gaaggcccc tgccagcccc tggcacgct gtgactttt	1440
	cctatgatgc ggcgcaggcg catcatttcg atctggagtc gggcgagcgt atcgcttagt	1500
	ttcggacgtg gggaggcgtc gaaaagcatc tttattttg accctccggg ggtgatttaa	1560
	cctaaaattc cacacaaacg tttcgaggt cattagattg ataagcatct gttgttaaga	1620
	aaggtgactt cctatgtcct cgatttccg caagaccggc gcgtcacttg cagccaccac	1680
	actgttggca gcgatcgac tggccggtt tagttcagac tcaagctccg actccacaga	1740
	ttccaccgct agcgaaggcg cagacagccg cgccccatc acctttgcga tgggcaaaaa	1800
	cgacaccgac aaagtcattc cgatcatcga ccgctggaac gaagcccacc ccgatgagca	1860
[0030]	ggtaacgtc aacgaactcg ccggtgaagc cgacgcgcag cgcgaaacct tcgtgcaatc	1920
	cctgcaggcc ggcaactctg actacgacgt catggcgtc gacgtcatct ggaccgcaga	1980
	cttcgcgga aaccaatggc tcgaccact tgaaggcgac ctgaggttag acacctccg	2040
	actgctgcaa tccaccgtg attccgcaac ctacaacggc acctctacg cactgccaca	2100
	gaacaccaac ggccagctac tgttcgcaa caccgaaatc atccagaag caccagcaaa	2160
	ctgggctgac ctctgtgaat cctgcacgt tctgaagaa gcaggcgtt attgcctgac	2220
	cactcagctc aagcagtagc aaggccttc agtgaacacc atcggttca tcgaaggtt	2280
	gggaggcagc gtcctagac atgacggcaa cgtcaccgta gacagcgac acgccaaggc	2340
	aggccttcaa gcgcttctg acggcttcga cgacggcacc atctccaagg catccctgc	2400
	agcgaccgaa gaagaaacca acctcgcat caccgaaggc caaacgcct acgccattaa	2460
	ctggccatac atgtacacca actccgaaga agccgaagca accgcaggca aattcgaagt	2520
	acagcccctc gtaggtaaag acggcgtcgg cgtatccacc cttggtggt acaacaacgg	2580
	catcaacgtc aactccgaaa acaaggcaac cgcccgac ttcacgaat tcatcatcaa	2640
	cgaagagaa caaacctggt tcgcgacaa ctcttccca ccagttctg catccatcta	2700
	cgatgatgag tccctgttg agcagtacc atacctgcca gactgaagg aatccctgga	2760
	aaacgcagca ccacgccag tgtctcttt ctaccagcc atctccaagg caatccagga	2820
	caacgcctac gcagcgtta acggcaacgt cgagttgac caggcaacca ccgatatgaa	2880
	ggcagcgatc gaaaacgctt ccagctagt cggtaattta gttcattctc cggccacctt	2940

[0031]

```

ccctgaaatc cttagcggat ttccacaaag gtggccggag tttgtccta ttgttgggtg 3000
taattgaact tgtgtgaaag gatlccgat ggcttccggc aaagatcttc aagtttccac 3060
atttggctac atctcccgt gccccgtgca ggtctacgaa gcaatcgcag atcccagaca 3120
actagaacgc tacttcgcca ccggcggagt atctggccgc ctcgaaaccg gatcgactgt 3180
ctattgggac ttctgtgatt ttcccgtgc gtttccggtc caagtgtct cagctacaca 3240
ggctgaacac attgaactcc gctggggaca agcaaatgag ctgcgttcg tcaacttga 3300
gttcgaacct tttagaaatt tcacccgcac gaaactcacc atcaccgaag gcagttggcc 3360
gctcactccc gcaggagccc aagaggctct gggcagccag atgggatgga ctggcatgct 3420
gtccgacta aaagcgtggc tggaatacgg agtgaacctc cgcgacgggt ttataagca 3480
ataggcaatg tgtccatcac gatgtgtggc ggattatgat ccatgtaaca agaattgca 3540
gtttcacaga actgacaatc aacttatttt gacctgaca aaggagcgac gacacatggc 3600
cacattcaaa caggccagaa gcgtgcctg gctgatgcc ccgcccctcg tggctctgc 3660
agtggatgac ggatatccca tcgtccgagc aatttggtta tccttcagg ccgacaaagg 3720
cctcgacccc accaccggac tcttcaccga cggtggttc gcaggactag acaattacct 3780
ctactggctc acccaacgat gcatgggttc agacggcacc atccgtacct gccacccgg 3840
cacactagcc accgacttct ggccagcact acgcatcacg ttgttctca ccgtggttac 3900
cgtcggcttg gaaactatcc tcggcaccgc catggcactg atcatgaaca aagaattccg 3960
tggtccgcga ctgttcgcg cagcgattct tatcccttg gcaatcccca ccgccgtcac 4020
cgcaaaactg tggcagttca tcttcgcacc acaaggcatc atcaactcca tgtttggact 4080
tagtgtcagt tggaccaccg atccgtgggc agctagagcc gccgtcattc ttgccgacgt 4140
ctggaaaacc acaccattca tggcactgct gatcctgcc ggtctgcaa tgatccgaa 4200
ggaaacctac gaagcagccc gcgtcgatgg cgcaaccgcg tggcagcaat tcaccaagat 4260
caccctcccg ctggtgcgcc cagctttgat ggtggcagta ctcttcgca cctcgatgc 4320
gctacgcatg tatgacctc ccgtcatcat gatctccagc tcctccaact ccccaccgc 4380
tgttatctc cagctggtt tggaagacat gcgccaaaac aacttcaact ccgcttcgc 4440
cctttccaca ctgatcttc tctgatctt ctctgtggcg ttcacatga tccgattcct 4500
cggcgcagat gtttcgggcc aacgcggaat aaagaaaaag aaactgggcg gaaccaagga 4560
tgagaaacc accgctaagg atgctgttgt aaaggccgat tctgctgtga aggaagccgc 4620
taagccatga ctaaacgaac aaaaggactc atctcaact acgccggagt ggtgttcac 4680
ctcttctggg gactagctc cttctactgg atggttatca ccgactgcg cgattccaag 4740
cacacctttg acaccacccc atggccaacg cagctcacct tggataactt ccgggacgca 4800
ctggccaccg acaaaggcaa caacttctc gcagccattg gcaactcact ggtcatcagc 4860
gtcaccacaa cagcgatcgc tgttctcgtg ggagtgttca ccgctacgc tctagcccga 4920
ctggaattcc cgggcaaagg cattgtcacc ggcacatct tggeagcctc catgttcccc 4980
ggcatgcgcc tggctactcc gctgttcag ctcttcggtg acctcaactg gatcggcacc 5040
taccaagcgc tgattatccc gaacatttcc ttcgcgtac ctctgacgat ctacacgctc 5100

```

```

gtatccttct tcaggcaact gccctgggaa ctggaagaat cagcacgtgt cgacggcgcc 5160
acacgtggcc aagccttcg catgatcctg ctccctctag cagcgcccg actatttacc 5220
accgcgatcc tcgattcat tgcaacgtgg aacgaattca tgctggcccg ccaactatcc 5280
aacacctcca cagagccagt gaccgttgcg atcgcaaggt tcaccggacc aagctccttc 5340
gaataccctc acgcctctgt catggcagcg ggagctttgg tgaccatccc actgatcatc 5400
atggtttctc tcttccaacg ccgcatcgtc tccggactca ccgcaggtgg cgtgaaagcc 5460
tagactagat actcatgagt gctgataaat cccaggacca atccgaatcg caacgcaaag 5520
ggcttcaacc cgaagcgctg ctggattccc tgggattttt ctcatctcgc gccgtcatcc 5580
aggcagtcac caacgtgtta cggccgaac ctgcccgtgtg gccagctctt ctgcgctcg 5640
ttttagtaat cgccacagtg tcagtatgga gggcttggcg aaagcgccgc cctaattaaa 5700
gttcctgcgc caacgccacg ataattccag atggcccgcg cagataaac aatcggtagg 5760
tgtcctcgta atttgcgac ccacttagtg gttccgcacc gatatgttcg atcgtttcct 5820
caatatcatc caccgcaaac atcaaacggt gcattccaat ctggttaggt gcagatggag 5880
cggttgcaat cggttccggt ttagatatt gagtaagctc caccgagaa tgtccatccg 5940
gagttttcag caccgcgac tcagatcgaa ttccgctgag accaacggtc cgatcagcaa 6000
aatccccttg gaccattgtt cggccatcta gggacatccc taatttctca aagaaccga 6060
ctgcttcac caacgattcc accacaatcg ccacgtgtgc caaacgttta attcccatga 6120
tcccacatgt aggtagcatc gtgtgatggc gatcatctac aacacatcga gcacgtcaa 6180
[0032] cggcttcac gcagacaaa 6199

```

<210> 26
 <211> 1701
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(6)
 <223> XbaI Schnittstelle

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(606)
 <223> stromaufw 鋟ts gelegene flankierende Region

<220>
 <221> Promoter
 <222> (607)..(1095)
 <223> Promotor Pgap

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (607)..(612)
 <223> ScaI Schnittstelle

<220>
 <221> Mutation
 <222> (1079)..(1079)
 <223> Austausch Nukleobase Thymin (T) durch Guanin (G)

<220>
 <221> Mutation

	<222> (1080)..(1080)	
	<223> Austausch Nukleobase Thymin (T) durch Cytosin (C)	
	<220>	
	<221> Mutation	
	<222> (1081)..(1081)	
	<223> Austausch Nukleobase Thymin (T) durch Guanin (G)	
	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1096)..(1695)	
	<223> cg0832	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1096)..(1695)	
	<223> stromabw 鋹 ts gelegene flankierende Region	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1696)..(1701)	
	<223> HindIII Schnittstelle	
	<400> 26	
	tctagagggt gtaattgaac ttgtgtgaaa ggagtcgga tggcttccgg caaagatctt	60
	caagtttcca catttggcta catctcccgc tgccccgtgc aggtctacga agcaatcgca	120
	gatcccagac aactagaacg ctacttcgcc accggcgag tatctggccg cctcgaaacc	180
	ggatcgactg tctattggga ctctgttgat ttccccggtg cgtttccggt ccaagttgtc	240
	tcagctacac aggctgaaca cattgaactc cgttggggac aagcaaatga gctgcgttcc	300
	gtcaacttcg agttcgaacc ttttagaaat ttcacccgca cgaaactcac catcaccgaa	360
	ggcagttggc cgctcactcc cgcaggagcc caagaggctc tgggcagcca gatgggatgg	420
	actggcatgc tgtccgact aaaagcgtgg ctggaatacg gagtgaacct ccgcgacggg	480
	ttttataagc aataggcaat gtgtccatca cgatgtgtgg cggattatga tccatgtaac	540
	aagaatgtgc agtttcacag aactgacaat caacttattt tgacctgaca aaaggagcga	600
	cgacacagta cttgaagcct aaaaacgacc gagcctattg ggattaccat tgaagccagt	660
	gtgagttgca tcacattggc ttcaaatctg agactttaat ttgtggattc acgggggtgt	720
	aatgtagtgc ataattaacc ccattcgggg gagcagatcg tagtgcaac gatttcaggt	780
	tcgttcctg caaaaactat ttagcgcaag tgttgaaat gccccgttt ggggtcaatg	840
	tccatttttg aatgtgtctg tatgattttg catctgctgc gaaatctttg ttccccgct	900
	aaagttgagg acaggttgac acggagttga ctgcacgaat tatccaatgt gagtaggttt	960
	ggtgcgtgag ttgaaaaaat tcgccatact cgcccttggg ttctgtcage tcaagaattc	1020
	ttgagtgacc gatgctctga ttgacctaac tgcttgacac attgcatttc ctacaatgc	1080
	gagaggagac acaac atg gcc aca ttc aaa cag gcc aga agc gct gcc tgg	1131
	Met Ala Thr Phe Lys Gln Ala Arg Ser Ala Ala Trp	
	1 5 10	
	ctg atc gcc ccc gcc ctc gtg gtc ctt gca gtg gtg atc gga tat ccc	1179
	Leu Ile Ala Pro Ala Leu Val Val Leu Ala Val Val Ile Gly Tyr Pro	
	15 20 25	
	atc gtc cga gca att tgg cta tcc ttc cag gcc gac aaa ggc ctc gac	1227
	Ile Val Arg Ala Ile Trp Leu Ser Phe Gln Ala Asp Lys Gly Leu Asp	
	30 35 40	

	ccc acc acc gga ctc ttc acc gac ggt ggc ttc gca gga cta gac aat	1275
	Pro Thr Thr Gly Leu Phe Thr Asp Gly Gly Phe Ala Gly Leu Asp Asn	
	45 50 55 60	
	tac ctc tac tgg ctc acc caa cga tgc atg ggt tca gac ggc acc atc	1323
	Tyr Leu Tyr Trp Leu Thr Gln Arg Cys Met Gly Ser Asp Gly Thr Ile	
	65 70 75	
	cgt acc tgc cca ccc ggc aca cta gcc acc gac ttc tgg cca gca cta	1371
	Arg Thr Cys Pro Pro Gly Thr Leu Ala Thr Asp Phe Trp Pro Ala Leu	
	80 85 90	
	cgc atc acg ttg ttc ttc acc gtg gtt acc gtc ggc ttg gaa act atc	1419
	Arg Ile Thr Leu Phe Phe Thr Val Val Thr Val Gly Leu Glu Thr Ile	
	95 100 105	
	ctc ggc acc gcc atg gca ctg atc atg aac aaa gaa ttc cgt ggc cgc	1467
	Leu Gly Thr Ala Met Ala Ile Met Asn Lys Glu Phe Arg Gly Arg	
	110 115 120	
	gca ctt gtt cgc gca gcg att ctt atc cct tgg gca atc ccc acc gcc	1515
	Ala Leu Val Arg Ala Ala Ile Leu Ile Pro Trp Ala Ile Pro Thr Ala	
	125 130 135 140	
	gtc acc gca aaa ctg tgg cag ttc atc ttc gca cca caa ggc atc atc	1563
	Val Thr Ala Lys Leu Trp Gln Phe Ile Phe Ala Pro Gln Gly Ile Ile	
	145 150 155	
	aac tcc atg ttt gga ctt agt gtc agt tgg acc acc gat ccg tgg gca	1611
	Asn Ser Met Phe Gly Leu Ser Val Ser Trp Thr Thr Asp Pro Trp Ala	
	160 165 170	
	gct aga gcc gcc gtc att ctt gcc gac gtc tgg aaa acc aca cca ttc	1659
	Ala Arg Ala Ala Val Ile Leu Ala Asp Val Trp Lys Thr Thr Pro Phe	
	175 180 185	
[0034]	atg gca ctg ctg atc ctc gcc ggt ctg caa atg atc aagctt	1701
	Met Ala Leu Leu Ile Leu Ala Gly Leu Gln Met Ile	
	190 195 200	

<210> 27
 <211> 200
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 27

Met Ala Thr Phe Lys Gln Ala Arg Ser Ala Ala Trp Leu Ile Ala Pro
1 5 10 15

Ala Leu Val Val Leu Ala Val Val Ile Gly Tyr Pro Ile Val Arg Ala
20 25 30

Ile Trp Leu Ser Phe Gln Ala Asp Lys Gly Leu Asp Pro Thr Thr Gly
35 40 45

Leu Phe Thr Asp Gly Gly Phe Ala Gly Leu Asp Asn Tyr Leu Tyr Trp
50 55 60

Leu Thr Gln Arg Cys Met Gly Ser Asp Gly Thr Ile Arg Thr Cys Pro
65 70 75 80

Pro Gly Thr Leu Ala Thr Asp Phe Trp Pro Ala Leu Arg Ile Thr Leu
85 90 95

Phe Phe Thr Val Val Thr Val Gly Leu Glu Thr Ile Leu Gly Thr Ala
 100 105 110
 Met Ala Leu Ile Met Asn Lys Glu Phe Arg Gly Arg Ala Leu Val Arg
 115 120 125
 Ala Ala Ile Leu Ile Pro Trp Ala Ile Pro Thr Ala Val Thr Ala Lys
 130 135 140
 Leu Trp Gln Phe Ile Phe Ala Pro Gln Gly Ile Ile Asn Ser Met Phe
 145 150 155 160
 Gly Leu Ser Val Ser Trp Thr Thr Asp Pro Trp Ala Ala Arg Ala Ala
 165 170 175
 Val Ile Leu Ala Asp Val Trp Lys Thr Thr Pro Phe Met Ala Leu Leu
 180 185 190
 Ile Leu Ala Gly Leu Gln Met Ile
 195 200

<210> 28
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

[0035]

<220>
 <221> Primer
 <222> (1).. (20)
 <223> cg0832_1.p

<400> 28
 gctggaatac ggagtgaacc

20

<210> 29
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<220>
 <221> Primer
 <222> (1).. (20)
 <223> cg0832_2.p

<400> 29
 gggattgccc aaggataag

20

<210> 30
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetische DNA

	<400> 30 gctctagatg cgttctgctc ctgacctt	28
[0036]	<210> 31	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> synthetische DNA	
	<400> 31 cgggatcctt tgcgttgcca ttcggatt	28

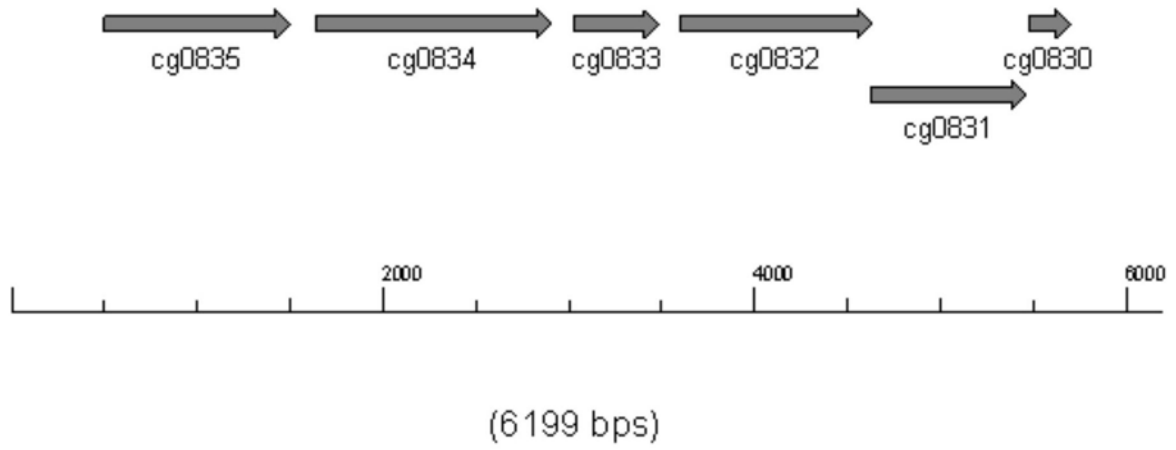


图1

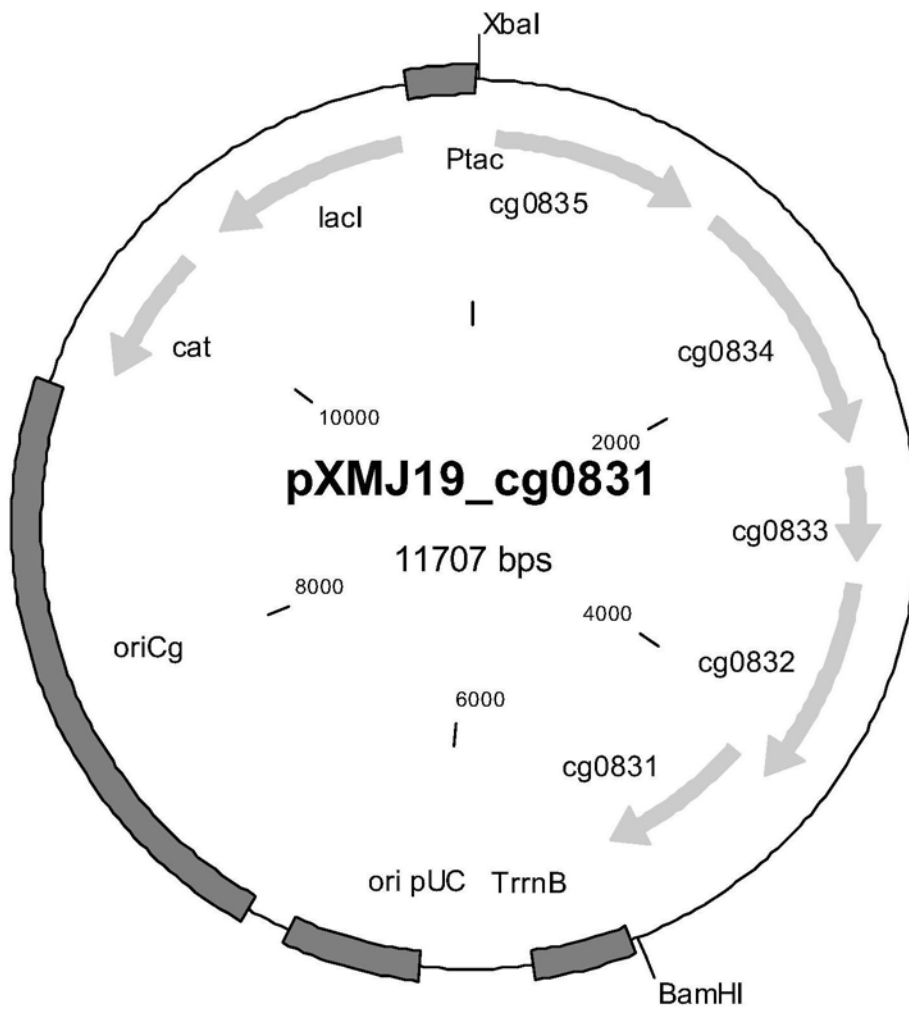


图2

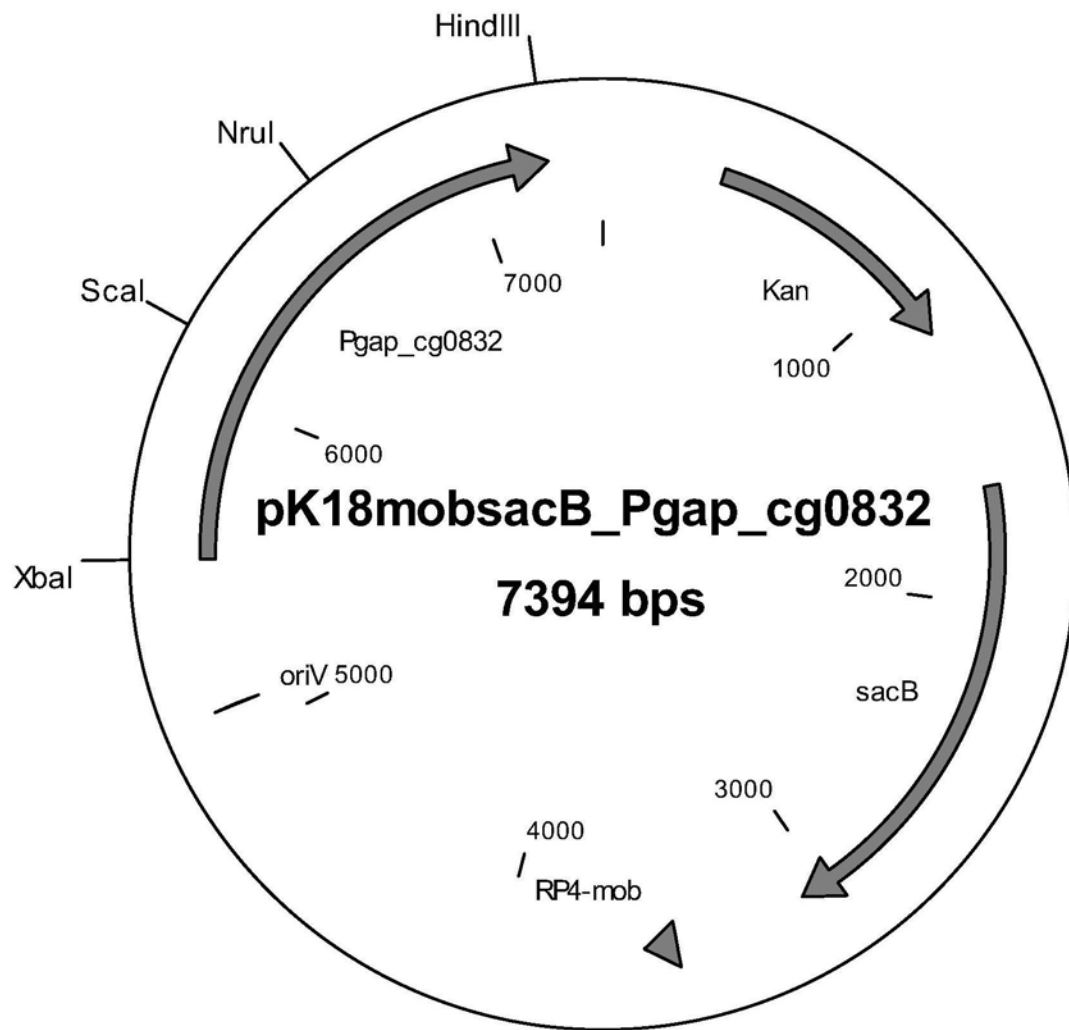


图3