

OpcA gént kódoló nukleotidszekvenciák**KIVONAT**

A találmány tárgyát opcA gént kódoló nukleotidszekvenciák képezik, valamint eljárás aminosavak, különösen az L-lizin fermentatív előállítására olyan korineform baktériumokat alkalmazva, amelyekben az opcA gént amplifikálták.

A találmány a fenti polinukleotid-szekvenciákkal transzformált korineform baktériumokra és a nukleotidszekvenciák hibridizációs próbaként való alkalmazására is vonatkozik.

Jelkérésre
Fertő



OpcA gént kódoló nukleotidszekvenciák

A találmány tárgyát opcA gént kódoló nukleotidszekvenciák képezik, valamint eljárás aminosavak, különösen az L-lizin fermentatív előállítására olyan korineform baktériumokat alkalmazva, amelyekben az opcA gént amplifikáltuk.

Az aminosavakat, különösen az L-lizint emberi orvoslásban és a gyógyszeriparban valamint az állatok takarmányozásában használják.

Ismert, hogy az aminosavakat korineform baktériumtörzsekkel fermentáltatják, elsősorban a *Corynebacterium glutamicum* mal. Nagy jelentősége miatt folyamatosan dolgoznak az előállítási eljárás továbbfejlesztésén. Az eljárások tökéletesítése vonatkozhat a fermentációs lépésekre, így például a rázatásra és az oxigén-ellátottságra, a tápközegek összetételére, mint például a cukor koncentrációjára a fermentáció során, vagy a termékké való feldolgozásra, például ioncserélő kromatográfiával, vagy magának a mikroorganizmusnak a termelőképességére.

A mikroorganizmusok termelőképességének fokozására a mutagenézis módszerét, a szelekciót és a mutáns szelekciót használják. Ilyen módon olyan törzseket kapnak, melyek antimetabolitokra, mint például az S-(2-aminoetil)-cisztein lizinanalógra rezisztensek, vagy a szabályozásban fontos szerepet játszó metabolitokra auxotrófok, és L-aminosavakat, mint



például az L-lizint termelnek. Néhány éve a rekombináns DNS technikát szintén használják az aminosavtermelő *Corynebacterium* törzsek továbbfejlesztésére.

A pentóz-foszfát ciklus jelentősége a bioszintézisben köztudott.

Így Oishi és Aida [Agricultural and Biological Chemistry, 29, 83-89 (1965)] már leírta a *Brevibacterium ammoniagenes*-ben működő hexóz-monofoszfát söntöt. Sugimoto és Shio [Agricultural and Biological Chemistry 51, 101-108 (1987)] a *Brevibacterium flavum*-ban található glükóz-6-foszfát dehidrogenáz szabályozását mutatták be. Sugimoto és Shio [Agricultural and Biological Chemistry 51, 1257-1263 (1987)] a *Brevibacterium flavum*-ban található glükóz-6-foszfát dehidrogenáz szabályozásáról számoltak be.

A JP-A-09224661 számú japán közzétételi irat a *Brevibacterium flavum* MJ-223 (FERM BP-1497) glükóz 6-foszfát dehidrogenáz zwf nevű génjének nukleotidszekvenciáját hozza nyilvánosságra. A JP-A-09224661 számú japán közzétételi irat Met Val Ile Phe Gly Val Thr Gly Asp Leu Ala Arg Lys Lys Leu sorrendként írja le a Zwf polipeptid N-terminális aminosav-szekvenciáját. Bár, ezt idáig nem sikerült megerősíteni.

Találmányunk célja, hogy az aminosavak, különösen az L-lizin fermentatív előállítására egy új javított eljárást dolgozzunk ki.

Az aminosavakat, különösen az L-lizint emberi orvoslásban és a gyógyszeriparban, és különösen az állati takarmányozásban alkalmazzák. Éppen ezért általános érdeklődésre tarthat számot az aminosavak, különösen az L-lizin előállítására vonatkozó új, tökéletesebb eljárások kidolgozása.



Amikor az elkövetkezőkben L-lizinről vagy lizinről lesz szó, nem csak magát az alapvegyületet, hanem ezek sóit, mint például a lizin-monohidrokloridot vagy a lizin-szulfátot is alatta értjük.

A találmány korineform baktériumból származó, izolált polinukleotidokat szolgáltat, amelyek legalább egy, a következőkből álló csoportból kiválasztott polinukleotid-szekvenciát tartalmaznak:

- a) polinukleotid, amely legalább 70%-ban azonos egy olyan polipeptidet kódoló polinukleotiddal, amely a 3. vagy 5. vagy 8. vagy 10. azonosítószámú aminosav-szekvenciák közül legalább egyet tartalmaz,
- b) polinukleotid, amely a 3. vagy 5. vagy 8. vagy 10. azonosítószámú aminosav-szekvenciával legalább 70%-ban azonos aminosav-szekvenciát tartalmazó polipeptideket kódol,
- c) olyan polinukleotid, amely komplementer a) vagy b) polinukleotiddal,
- d) olyan polinukleotid, amely az a) vagy b) vagy c) polinukleotid-szekvenciák legalább 15 egymást követő nukleotidját tartalmazza.

A találmány mindezek mellett olyan 1. igénypont szerinti polinukleotidot is biztosít, ami előnyösen egy olyan replikálódni képes DNS, mely tartalmaz:

- (i) egy vagy több, az 1., 4., 6., 9. azonosítószámú szekvenciákat tartalmazó csoportból kiválasztott nukleotidszekvenciát, vagy
- (ii) legalább egy olyan szekvenciát, amelyik megfelel az (i) szekvenciának a genetikai kód degeneráltsági határain belül,

vagy

(iii) legalább egy olyan szekvenciát, amelyik hibridizál az (i) vagy (ii) szekvencia komplementer szekvenciájával, és adott esetben

(iv) funkcionálisan semleges szensz mutációkat az (i)-ben.

A találmány továbbá az alábbiakat szolgáltatja:

olyan 4. igénypont szerinti polinukleotidot, amely tartalmazza a 4. vagy 9. azonosítószámon bemutatott nukleotid-szekvenciát,

olyan 6. igénypont szerinti polinukleotidot, amely legalább egy, a 3. vagy 5. vagy 8. vagy 10. azonosítószámú szekvenciában bemutatott aminosavszekvenciát tartalmazó polipeptidet kódol,

egy 1. igénypont szerinti polinukleotidot kódoló vektort,

és olyan korineform baktériumokat, amelyek a vektort tartalmazó gazdaként szolgálnak.

A találmány egyúttal olyan polinukleotidokat is nyújt, amelyek lényegében egy olyan polinukleotid-szekvenciát tartalmaznak, melyet szkríneléssel úgy kaphatunk meg, hogy a megfelelő génkönyvtárat, mely a 4. vagy 9. azonosítószámú szekvenciáknak megfelelő polinukleotid-szekvenciával rendelkező teljes gént tartalmazza, egy olyan próbával hibridizáltatjuk, amely tartalmazza az említett, a 4. vagy 9. azonosítószámú szekvenciáknak megfelelő polinukleotidokat vagy ezek fragmenseit, és az említett DNS-szekvenciát izoláljuk.

A találmány szerinti polinukleotid-szekvenciák RNS, cDNS és DNS hibridizációs próbáiként is alkalmazhatóak azon célból, hogy izoláljuk teljes hosszában a cDNS-t, amely az OpcA fehérjét kódolja, és hogy azokat a cDNS-eket vagy géneket izolálni lehessen.



kóz-6-foszfát dehidrogenáz Zwf alegységét képezi. A transzlációs termék aminosav sorrendjét a 2. és 7. azonosítószámú szekvenciák mutatják. A 11. azonosítószámú szekvenciában a glükóz-6-foszfát dehidrogenáz Zwf alegységének N-terminális aminosav sorrendjét mutatjuk be, amelyet izolálni lehet.

A találmány ezen kívül aminosavak, különösen az L-lizin fermentatív előállításának eljárását is biztosítja, amelyhez olyan korineform baktériumokat használunk, amelyek jellemzően már termelnek egy aminosavat, és amelyekben az OpcA gént kódoló nukleotidszekvenciák amplifikáltak, adott esetben a zwf génnel együtt.

Ebben a vonatkozásban az "amplifikáció" szó a megfelelő DNS által kódolt egy vagy több enzim (fehérje) intracelluláris aktivitásának növekedését jelenti a mikroorganizmusban, például a gén vagy gének kópiaszámának növekedése következtében, egy erős promótert alkalmazva, vagy olyan gént alkalmazva, ami egy megfelelő, nagy aktivitású enzimet (fehérjét) kódol. Adott esetben az utóbbi két módszert kombinálni lehet.

A találmány szerinti mikroorganizmusok az L-aminosavakat, különösen az L-lizint glükózból, szacharózból, laktózból, fruktózból, maltózból, melaszából, keményítőből, cellulózból vagy glicerinnél és etilalkoholból termelhetik. Ezek a korineform baktériumok képviselői, elsősorban a *Corynebacterium* nemzetség tagjai lehetnek. A *Corynebacterium* genusz képviselői közül elsősorban a *Corynebacterium glutamicum* fajt kell megemlíteni, amely az egyik legjobb L-aminosav termelőként ismert.

A *Corynebacterium* nemzetség, különösen a *Corynebacterium glutamicum* faj megfelelő törzsei például az alábbi ismert vad



típusú törzsek:

Corynebacterium glutamicum ATCC 13032

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC 13870

Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539

Corynebacterium melassecola ATCC 17965

Brevibacterium flavum ATCC 14067

Brevibacterium lactofermentum ATCC 13869 és

Brevibacterium divaricatum ATCC 14020,

és a belőlük előállított L-lizint termelő mutánsok vagy törzsek, mint például:

Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709

Brevibacterium flavum FERM-P 1708

Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712

Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463

Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464

Corynebacterium glutamicum DSM 5715

Corynebacterium glutamicum DM 58-1

Corynebacterium glutamicum DSM 12866

és a belőlük előállított L-treonint termelő mutánsok vagy törzsek, mint például:

Corynebacterium glutamicum ATCC 21649

Brevibacterium flavum BB69

Brevibacterium flavum DSM5399

Brevibacterium lactofermentum FERM-BP 269

Brevibacterium lactofermentum TBB-10

és a belőlük előállított L-izoleucint termelő mutánsok vagy törzsek, mint például:



Corynebacterium glutamicum ATCC 14309

Corynebacterium glutamicum ATCC 14310

Corynebacterium glutamicum ATCC 14311

Corynebacterium glutamicum ATCC15168

Corynebacterium ammoniagenes ATCC 6871

és a belőlük előállított L-triptofánt termelő mutánsok vagy törzsek, mint például:

Corynebacterium glutamicum ATCC 21850 és

Corynebacterium glutamicum KY 9218 (pKW9901).

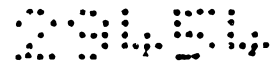
Sikerült izolálnunk a *Corynebacterium glutamicum* új *opcA* génjét, amely a glükóz 6-foszfát dehidrogenáz (EC 2.7.1.11) *Opca* alegységét kódolja.

Az *opcA* gén vagy más *C. glutamicum*-ból származó gén izolálásához is először *E. coli*-ban kell létrehozni ennek a mikroorganizmusnak egy génkönyvtárát. A génkönyvtárak előállításának módját az általánosan ismert és használt könyvek és kézikönyvek tartalmazzák. Példaként említhetjük Winacker könyvét: *Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie* [Genes and Clones, An Introduction to Genetic Engineering (Verlag Chemie, Weinheim, Németország, 1990)] vagy Sambrook és munkatársainak kézikönyvét: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Egy nagyon jól ismert génkönyvtár az *E. coli* K-12 W3110 törzsének génkönyvtára, melyet λ vektorokban hoztak létre [Kohara és munkatársai, *Cell* 50, 495-508 (1987)]. Bathe és munkatársai [Molecular and General Genetics, 252, 255-265 (1996)] *C. glutamicum* ATCC 13032 törzsének génkönyvtárát írták le, amelyet SuperCos I kozmid vektor segítségével készítettek el [Wahl és munkatársai, *Proceedings of National Academy of Sciences*



USA, 84, 2160-2164 (1987)] *E. coli* K-12 NM554 törzsében [Raleigh és munkatársai, *Nucleic Acid Research*, 16, 1563-1575 (1988)]. Börmann és munkatársai [*Molecular Microbiology* 6(3), 317-326 (1992)] pedig *C. glutamicum* ATCC 13032 törzsének génkönyvtárát írták le pH79 kozmid vektor felhasználásával [Hohn és Collins, *Gene* 11, 291-298 (1980)]. O'Donohue [The Cloning and Molecular Analysis of Four Common Aromatic Amino Acids Biosynthetic Genes from *Corynebacterium glutamicum* Ph.D. értekezés, National University of Ireland, Galway, (1997)] *C. glutamicum* gének klónozását írja le, λ Zap expressziós rendszer [Short és munkatársai, *Nucleic Acid Research*, 16, 7583] felhasználásával. A *C. glutamicum* génkönyvtárának *E. coli*-ban való előállításához más plazmidok is felhasználhatók, mint például pBR322 [Bolivar, *Life Sciences* 25, 807-818 (1979)] vagy a pUC9 [Vieira és munkatársai, *Gene* 19, 259-268 (1982)]. Megfelelő gazdakként különösen azok az *E. coli* törzsek alkalmazhatók, amelyek restriktióra és rekombinációra hiányosak. Erre egy jó példa a DH5 α mc^r jelű törzs, amelyet Grant és munkatársai [*Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 87, 4645-4649 (1990)] írtak le. A kozmidok segítségével klónozott hosszú DNS fragmensek ezután szubklónozhatók, és azt követően a szokásos, erre alkalmas vektorokban például a Sanger és munkatársai által leírt módon [*Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 74, 5463-5467 (1977)] szekvenálhatók.

A kapott nukleotidszekvenciák ezután a ismert algoritmusokkal vagy szekvencia-elemző programokkal analizálhatók, mint amilyen például Staden programja [*Nucleic Acid Research* 14, 217-232 (1986)], Butler GCG programja [*Methods of Biochemical Analysis*, 39, 74-97 (1998)], Pearson és Lipman FASTA algoritmus



[Proceedings of National Academy of Sciences, USA, 85, 2444-2448 (1988)] vagy Altschul és munkatársainak BLAST algoritmus [Nature Genetics, 6, 119-129 (1994)], majd ezután a nyilvános adatbázisokban megtalálható szekveciaadatokkal hasonlíthatók össze. A nyilvánosság számára elérhető adatbankok például az European Molecular Biology Laboratories (EMBL, Heidelberg, Németország) vagy a National Center for Biotechnology Information (NCBI Bethesda, MD, USA) adatbankja.

A találmány a *C. glutamicum* új *opcA* gént kódoló DNS szekvenciáját szolgáltatja, amelyet az 1. és 4. azonosítószámú szekvenciák mutatnak. Továbbá a megfelelő fehérje aminosav-sorrendje a jelen DNS szekvenciából származott a fentebb leírt módszerekkel. Az *OpcA* géntermék kapott aminosav-sorrendjét a 3. és 5. azonosítószámú szekvenciák mutatják. Az *OpcA* géntermék aminosav-sorrendjéből kapott molekulatömeg körülbelül 34,7 kilodalton.

Az 1. azonosítószámú szekvencia továbbá mutatja a *zfw* gént kódoló régiót. A *Zwf* géntermékből kapott aminosav-szekvenciát a 2. azonosítószámú szekvencia tartalmazza. A *Zwf* géntermékből kapott aminosav-szekvencia molekulatömege körülbelül 57,5 kilodalton.

A korábban említett módon előállított génkönyvtár a továbbiakban úgy vizsgálható, hogy ismert szekvenciák nukleotid próbáival, mint például a *zfw* génnel (JP-A-09224661 számú japán közzétételi irat) hibridizáltatjuk. A klónoknak azok a klónozott DNS szekvenciái, amelyek a hibridizációban pozitív reakciót mutatnak, szekvenálhatók, s így egyrészt a próbaként alkalmazott DNS ismert nukleotidszekvenciáját, másrésztől szomszédos új DNS szekvenciákat szolgáltatnak.



sen, amelyek az OpcA génnel nagyfokú hasonlóságot mutatnak.

A találmány szerinti polinukleotid-szekvenciák továbbá primereként alkalmazhatóak a polimeráz láncreakcióban (PCR) az OpcA fehérjét kódoló gének DNS-ének előállításához.

Az ilyen oligonukleotidok, amelyek próbákként vagy primereként szolgálnak, legalább 30, előnyösen legalább 20, még előnyösebben legalább 15 egymást követő nukleotidot tartalmaznak.

Azok az oligonukleotidok, amelyek 40 vagy 50 bázispárt tartalmaznak, szintén megfelelőek.

Az "izolált" azt jelenti, hogy természetes környezetétől elkülönített.

A "polinukleotid" kifejezés általánosságban a poliribonukleotidokra vagy a polidezoxiribonukleotidokra vonatkozik, amelyben az RNS vagy DNS módosítatlan vagy módosított lehet.

A "polipeptidek"-en olyan peptideket vagy fehérjéket értünk, amelyek két vagy több aminosavat tartalmaznak peptidkötéssel összekötve.

A találmány szerinti polipeptidek magukba foglalják a 3., 5. 8. vagy 10. azonosítószámú szekvencia szerinti polipeptideket, különösen azokat, amelyek az OpcA géntermék biológiai aktivitásával rendelkeznek, és azokat is, amelyek legalább 70%-ban azonosak a 3., 5. 8. vagy 10. azonosítószámú szekvencia szerinti polipeptidekkel, és előnyösen legalább 80%-ban azonosak, és különösen 90-95%-ban azonosak a 3., 5., 8. vagy 10. azonosítószámú szekvencia szerinti polipeptidekkel, és mutatják a korábban említett aktivitást.

A találmány az új Zwf fehérjét is szolgáltatja, amely a glü-

A találmány a *Corynebacterium glutamicum* opcA gént kódoló új DNS szekvenciáját is szolgáltatja, amely a 6. és 9. azonosítószámú szekvenciaként a találmány részét képezi. A korábban említett módszerekkel ebből a DNS-ből a megfelelő fehérje aminosav-szekvenciáját kaptuk meg. Az OpcA géntermékből kapott aminosav-szekvenciát a 8. és 10. azonosítószámú szekvenciákban mutatjuk be. Az OpcA géntermékből kapott aminosav-szekvencia molekulatömege 34,7 kilodalton.

A 6. azonosítószámú szekvencia továbbá bemutatja a zfw gént kódoló régiót is. A Zwf géntermékből kapott aminosav-szekvenciát a 7. azonosítószámú szekvenciában mutatjuk be. A Zwf géntermékből kapott aminosav-szekvencia molekulatömege körülbelül 57,5 kilodalton.

Egy másik eljárás az OpcA fehérje és Zwf fehérje aminosav-sorrendjének legalább részleges meghatározására a glukóz-6-foszfát dehidrogenáz enzimfehérje kromatográfiás módszerekkel történő tisztításából áll. A fehérjék tisztítására és előállítására alkalmas módszerek és útmutatások megtalálhatók például Schleifer és Wensink kézikönyvében: *Practical Methods in Molecular Biology* [Springer Verlag, Berlin, Németország (1981)], Harris és Angal kézikönyvében: *Protein Purification Methods: A Practical Approach* [IRL Press, Oxford, UK (1989)], Scopes tankönyvében: *Protein Purification: Principles and Practice* 3. kiadás [Springer Verlag, New York, USA (1993)] valamint az általánosan ismert tankönyvekben és kézikönyvekben. A tisztított polipeptidek N-terminális aminosav-szekvenciáját Edman módszerével [Archives of Biochemistry 22, 475 (1949)] lehet meghatározni. A fehérjék szekvenálásának egyéb módszerei és útmutatói például

az alábbi művekben lelhetők fel: Smith, Protein Sequencing Protocols: Methods in Molecular Biology, 64. és 112. kötetek, Humana Press, Totowa, NJ, USA, (1996), Kamp és munkatársai: Protein Structure Analysis: Preparation, Characterization, and Microsequencing [Springer Verlag, New York, NY, USA (1997)].

Ezen a módon kimutatható volt, hogy a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz enzim két alegységből áll, minden esetben egy 30 és egy 60 kDa molekulatömegű darabból. Az OpcA alegység és az OpcA fehérje N-terminális végének aminosav-sorrendjét a 12. azonosítószámú szekvencia mutatja be. A Zwf alegység és a Zwf fehérje N-terminális végének aminosav sorrendjét a 11. azonosítószámú szekvencia mutatja be.

Az 1., 4., 6. vagy 9. azonosítószámú DNS szekvenciákból a genetikai kód degeneráltsága alapján kapható kódoló DNS-szekvenciák szintén a találmány lényeges részét képezik. Ugyanúgy a találmányhoz tartoznak azok a DNS szekvenciák, amelyek hibridizálnak a 4. vagy 9. azonosítószámú szekvenciákkal vagy azok egy részével. A fehérjékben a konzervatív aminosavcserék, mint például glicin cseréje alaninra vagy aszparaginsav cseréje glutaminsavra a szakemberek között „szensz mutációk” néven ismertek. Ezek nem okoznak alapvető változást a fehérje aktivitásában, azaz semleges funkciójúak. Az is ismert továbbá, hogy a fehérje C- és/vagy N-terminálisában bekövetkező változások a fehérjét lényegesen nem rontják el, sőt még stabilizálhatják is annak funkcióját. A szakterületen jártasak ezzel kapcsolatban információkat találnak többek között Ben-Bassat és munkatársainak művében [Journal of Bacteriology 169, 751-757 (1987)], O'Regan és munkatársainak művében [Gene, 77, 237-251 (1989)],

Sahin-Toth és munkatársainak művében [Protein Sciences 3, 240-247 (1994)], Hochuli és munkatársainak művében [Bio/Technology 6, 1321-1325. (1988)], valamint genetikai és molekuláris biológiai tankönyvekben. A találmány tartalmazza a 3., 5., 8. vagy 10. azonosítószámú szekvenciákból a megfelelő módon keletkező aminosav-szekvenciákat is.

Végül, a találmánynak azon DNS szekvenciák is részét képezik, amelyeket polimeráz láncreakció (PCR) segítségével a 4. vagy 9. azonosítószámú szekvenciákból kapott primerek felhasználásával állítottunk elő. Ezek az oligonukleotidok jellemzően legalább 15 nukleotid hosszúságúak.

A DNS szekvenciák hibridizáció segítségével történő azonosítására útmutató található többek között a Boehringer Mannheim GmbH kézikönyvében [Mannheim, Németország (1993)] "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" címmel, valamint Liebl és munkatársainak művében [International Journal of Systematic Bacteriology, 41, 255-260 (1991)]. DNS szekvenciák polimeráz láncreakció (PCR) segítségével történő felszaporítására instrukciók nyerhetők többek között Gait kézikönyvéből: Oligonucleotide synthesis: a practical approach [IRL Press, Oxford, UK (1984)] valamint Newton és Graham PCR című művéből [Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Németország (1994)].

Felismertük, hogy a korineform baktériumok az opcA gén, adott esetben a zwf génnel együtt történő túlexpresszáltatása után az aminosavakat, különösen az L-lizint jobban állítják elő.

A túltermelés (túlexpresszállódás) elérhető a megfelelő gének kópiaszámának megnövelésével vagy a struktúrgén előtt elhelyezkedő promóter és regulátor régiók vagy a riboszóma kötőhely mu-

tálatásával. A struktúrgén elé beépített expressziós kazetták ugyanezen a módon működnek. Indukálható promóterek alkalmazásával további lehetőség nyílik az expresszió fokozására az L-lizin fermentatív előállítása során. Az expresszió valószínűleg az mRNS életidejének meghosszabbításával is javítható. Az enzimaktivitás továbbá azáltal is megnövelhető, hogy az enzimfehérje lebomlását megakadályozzuk. A gének vagy génkonstrukciók eltérő kópiaszámú plazmidokon vagy a kromoszómába integrálódva és amplifikált formában lehetnek jelen. Egy másik alternatíva szerint a megfelelő gének túlexpresszálandósága a tápközeg összetételének vagy a tenyésztés feltételeinek módosításával is elérhető.

A szakterületen jártasak ezzel kapcsolatban útmutatást találnak többek között Martin és munkatársainak művében [Bio/Technology 5, 137-146 (1987)], Guerrero és munkatársainak művében [Gene 138, 35-41 (1994)], Tsuchiya és Morinaga művében [Bio/Technology 6, 428-430 (1988)], Eikmanns és munkatársainak művében [Gene 102, 93-98 (1991)], az EP 0472 869 számú európai szabadalmi leírásban, az US 4 601 893 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban, Schwarzer és Pühler munkájában [Bio/Technology 9, 84-87 (1991)], Reinsceid és munkatársainak művében [Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)], LaBarre és munkatársainak művében [Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)], WO 96/15246 nemzetközi közlési iratban, Malumbers és munkatársainak művében [Gene 134, 15-24 (1993)], a japán nyelven kiadott JP-A-10-229891 számú szabadalmi leírásban, Jensen és Hammer munkájában [Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)], Makrides munkájában [Microbiological Reviews 60, 512-538 (1996)] és az ismert geneti-

kai valamint molekuláris biológiai kézikönyvekben.

A példákban a találmány szerinti *opcA* gént plazmidok segítségével túlexpresszáltattuk.

Erre azok a plazmidok alkalmasak, amelyek a korineform baktériumokban replikálódnak. Számtalan plazmidvektor ismert, mint például pZ1 [Menkel és munkatársai, *Applied and Environmental Microbiology* 64, 549-554 (1989)], a pEKEx1 [Eikmanns és munkatársai, *Gene* 102, 93-98 (1991)] vagy a pHS2-1 [Sonnen és munkatársai, *Gene* 107, 69-74 (1991)], amelyek a pHM1519, pBL1 vagy pGA1 kriptikus plazmidokon alapulnak. Más plazmid vektorokat, mint például azokat, amelyek a pCG4-en [US A 4 489 160 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás], pNG2-n [Serwold-Davis és munkatársai, *FEMS Microbiology Letters* 66, 119-124 (1990)] vagy pAG1-n [US A 5 158 891 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás] alapulnak, ugyanilyen módon lehet használni.

Példánkban a 2. ábrán látható, *E. coli* - *C. glutamicum* pEC-T18mob2 ingázó vektort alkalmaztuk. Az *opcA* és *zwf* géneknek a pEC-T18mob2 vektor SphI/SalI hasítási hely régiójába való beillesztése után létrejött pECzwfopcA plazmid a 3. ábrán látható.

Azok is alkalmas plazmidvektorok, amelyek génamplifikáció segítségével kromoszómába integrálódnak, amint ez megtalálható Reincheid és munkatársainak [Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)] művében a *hom-thrB* operon duplikációjával vagy amplifikációjával kapcsolatban. Ebben a módszerben a teljes gént olyan plazmid vektorba klónozták, amely egy gazdában replikálódni tud (jellemzően *E. coli*-ban), de a *C. glutamicum*-ban nem. Lehetséges vektorok például a pSUP301 [Simon és munkatársai, *Bio/Technology* 1, 784-791 (1983)], a pK18mob vagy a



pK19mob [Schafer és munkatársai, *Gene* 145, 69-73 (1994)], a pGEM-T (Promega Corporation, Madison, WI, USA), a pCR2.1-TOPO [Shuman, *Journal of Biological Chemistry*, 269, 32678-84 US-A 5,487,993 (1994)], a pCR®Blunt [Invitrogen, Groningen, Holland; Bernard és munkatársai, *Journal of Molecular Biology* 234, 534-541 (1993)], a pEM1 Schrupf és munkatársai *Journal of Bacteriology* 173, 4510-4516 (1991)] vagy a pBGS8 [Spratt és munkatársai *Gene* 41, 337-342 (1986)]. Az amplifikálandó gént hordozó plazmid ezután a kívánt *C. glutamicum* törzsbe juttatható konjugációval vagy transzformációval. A konjugáció módszerének leírása megtalálható Schafer és munkatársainak [Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)] művében. A transzformáció módszerét például Thierbach és munkatársai [Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)], Dunican és Shivan [Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)] valamint Tauch és munkatársai [FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)] írták le. "Cross over" segítségével történő homológ rekombináció után a kapott törzs legalább két példányban tartalmazza a kérdéses gént.

Továbbá az aminosavak, különösen az L-lizin termelése szempontjából előnyös amplifikálni vagy túlexpresszálni a megfelelő bioszintetikus útvonal, a glikolízis, az anaplerózis, a pentóz-foszfát ciklus vagy az aminosav export egy vagy több enzimét, amellet, hogy az *opcA* gént, adott esetben a *zwf* génnel együtt amplifikáltuk.

Így például az L-lizin előállításához előnyös lehet, hogy egy vagy több, az alábbi csoportból kiválasztott gén amplifikálva, különösen túltermelve legyen ugyanabban az időben:

- a *dapA* gén, amely dihidropikolinát szintáz enzimet kódolja



(EP B 0 197 335 számú európai szabadalmi leírás)

- a lysC gén, amely az aszpartát kináz feed back rezisztenciáját kódolja [Kalinowski és munkatársai, Molecular and General Genetics 224, 317-324 (1990)],
- a gap gén, amely a glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenázt kódolja [Eikmanns Journal of Bacteriology 174, 6076-6086 (1992)],
- a pyc gén, amely a piruvát karboxiláz enzimet kódolja (DE-A-198 31 609 számú német közzétételi irat)
- a tkt gén, amely a transzketolázt kódolja [az European Molecular Biology Laboratories adatbank nyilvántartási száma: AB023377 (EMBL, Heidelberg, Németország)],
- a gnd gén, amely a 6-foszfoglükonát dehidrogenázt (JP-A-9-224662 számú japán közzétételi irat) kódolja,
- a lyse gén, amely a lizin exportot (DE-A-195 48 222 számú német közzétételi irat) kódolja
- a zwf gén (DE 199 59 328.0 számú német szabadalmi bejelentés; DSM 13115) vagy
- az eno gén, amely az enolázt kódolja (DE 199 41 478.5 számú német szabadalmi bejelentés),
- a tal gén, amely a transzaldolázt kódolja (DSM 13263)

Aminosavak, különösen az L-lizin termeltetése szempontjából előnyös lehet ugyanabban az időben gyengíteni:

- a pck gént, amely a foszfoenol-piroszőlősav karboxikinázt kódolja (DE 199 50 409.1 számú német szabadalmi bejelentés, DSM 13047)
- a pgi gént, amely a glükóz-6-foszfát izomerázt kódolja (US 09/396,478 számú szabadalmi bejelentés, DSM 12969, vagy



- a poxB gént, amely a piruvát oxidázt kódolja (DE 199 51 975.7 számú német szabadalmi bejelentés, DSM 13114)
- a zwa gént (DE 199 59 327.2 számú német szabadalmi bejelentés, DSM 13113),

amellett, hogy az OpcA gént, adott esetben a zwf génnel együtt amplifikáljuk.

Ezen kívül az opcA gén túlexpresszáltatásához előnyös az aminosavak, különösen az L-lizin termelése szempontjából a nem kívánatos mellékreakciókat kiiktatni [Nakayama: "Breeding of Amino AcidProducing Microorganisms" in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (szerk.), Academic Press, London, UK (1982)].

A találmány szerint előállított mikroorganizmusok tenyésztéséhez lehet folyamatos vagy szakaszos eljárást is alkalmazni, ekkor a "feed batch" vagy az ismételt "feed batch" eljárást alkalmazzuk az L-aminosavak, különösen az L-lizin termeltetéséhez. Az ismert tenyésztési módszerek összefoglalása Chmiel kézikönyvében [Bioprotzesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1991)] valamint Storhas könyvében [Bioreaktoren und periphere Einrichtungen, Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden (1994)] található meg.

Az alkalmazott tenyészközegnek az adott törzs minden igényét megfelelően ki kell elégítenie. A legkülönbözőbb mikroorganizmusok számára megfelelő tápközegek leírását az Amerikai Bakteriológiai Társaság "Manual of Methods for General Bacteriology" [Washington D. C., USA, (1981)] című kiadványa tartalmazza. Szénforrásokként cukrok és egyéb szénhidrátok, mint például glükóz,



szacharóz, laktóz, fruktóz, maltóz, melasz, keményítő és cellulóz, vagy olajok és zsírok, mint a szója olaj, napraforgó olaj, mogyoró és kókusz olaj, zsírsavak, mint például palmitinsav, sztearinsav és linolénsav, alkoholok, mint például a glicerín és az etanol, valamint szerves savak, mint amilyen például az ecetsav, használhatók. Ezek az anyagok egyenként vagy kevert formában is alkalmazhatók. A nitrogénforrásként nitrogént tartalmazó szerves szubsztrátok alkalmazhatóak, mint például peptonok, élesztő- és húskivonat, maláta kivonat, gabona pácok, szójaliszt vagy karbamid, vagy szervetlen anyagok, mint az ammónium-szulfát, ammónium-klorid, ammónium-foszfát, ammónium-karbonát és ammónium-nitrát. A nitrogénforrások a szénforrásokhoz hasonlóan egyenként vagy keverékekben is felhasználhatók. A használható foszforforrások a következők: foszforsav, kálium-dihidrogén-foszfát, dikálium-hidrogén-foszfát vagy a megfelelő nátriumot is tartalmazó foszforsó. A tenyészközegnek továbbá fémsókat, mint például magnézium- vagy vas-szulfátot kell tartalmaznia, amelyek a sejtek növekedéséhez szükségesek. Végül nélkülözhetetlen növekedési faktorok, mint például az aminosavak és vitaminok adagolhatók a fent említett anyagok mellett. A tápközeghez ezen kívül megfelelő prekursorok is keverhetők. A meghatározott anyagok a tenyészethez egyszeri adagban vagy megfelelő módon a tenyésztés során folyamatosan adagolhatóak.

Olyan alapanyagok, mint a nátrium-hidroxid, kálium-hidroxid, ammónia vagy ammónium-hidroxid valamint a savas alkotóelemek, mint például a foszforsav vagy kénsav a tenyészet pH-jának szabályozásában közvetlenül is részt vesznek. A habzásgátlók, mint például a zsírsav-poliglikol észterek, a habzás gátlására hasz-



nálhatók. A plazmidstabilitás fenntartása céljából a megfelelő szelektív hatású anyagok, mint például antibiotikumok alkalmazhatóak. Oxigén vagy oxigént tartalmazó gázkeverék, mint például a levegő alkalmazásával a tenyészet aeráltsága biztosítható. A tenyészet hőmérsékletét normál körülmények között 20-45°C-ra, előnyösebben 25-40°C-ra állítjuk be. A tenyésztés addig folytatódik, míg az adott L-aminosav maximális mennyisége nem képződik. Ez általában a tenyésztés 10. és 160. órája között következik be.

Az L-aminosavakat anioncserélő kromatográfiával ninhidrin segítségével analizálhatjuk, ahogy ezt Spackman és munkatársai leírják [Analytical Chemistry, 30, 1190 (1958)].

A következő mikroorganizmust a Budapesti Szerződés szerint helyeztük letétbe a Német Törzsgyűjteményben (Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ, Braunschweig, Németország):

DSM 13264 azonosító számon a *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032/pECzwfopca.

Az 1. azonosítószámú szekvencia az új devB gént is tartalmazza. A találmány szerinti eljárást az aminosavak, különösen az L-lizin fermentatív előállítására alkalmazzuk.

A szekvencialista formájában csatolt szekvenciák az alábbiak:

Szekvencia azonosítószáma	Leírás
1.	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13032 törzséből izolált DNS szekvencia
2.	Az 1. azonosítószámú szekvenciából származó Zwf

	fehérje aminosav-szekvenciája
3.	Az 1. azonosítószámú szekvenciából származó OpcA fehérje aminosav-szekvenciája
4.	Az ATCC13032 törzs OpcA génjének 1. azonosítószámú szekvenciából származó DNS szekvenciája
5.	A 4. azonosítószámú szekvenciából származó OpcA fehérje aminosav-szekvenciája
6.	<i>Corynebacterium glutamicum</i> AS019 törzséből izolált DNS szekvencia
7.	A 6. azonosítószámú szekvenciából származó Zwf fehérje aminosav-szekvenciája
8.	A 6. azonosítószámú szekvenciából származó OpcA fehérje aminosav-szekvenciája
9.	Az AS019 törzs származó OpcA génjének DNS szekvenciája a 6. azonosítószámú szekvenciából
10.	A 9. azonosítószámú szekvenciából származó OpcA fehérje aminosav-szekvenciája
11.	Az ATCC13032 törzsből izolálható glükóz-6-foszfát dehidrogenáz Zwf fehérjéjének N-terminális aminosav-szekvenciája
12.	Az ATCC13032 törzsből izolálható glükóz-6-foszfát dehidrogenáz OpcA fehérjéjének N-terminális aminosav-szekvenciája

A következő ábrákat csatoltuk:

1. ábra: pBOB102 plazmid térképe
2. ábra: pEC-T18mob2 plazmid térképe
3. ábra: pECzwfopcA plazmid térképe

Az alábbi rövidítéseket használtuk:

1. ábra:

Neo r:	Neomicin/kanamicin rezisztencia
ColE1 ori:	ColE1 plazmid replikációs origója
CMV:	Citomegalovírus promóter
lacP:	lac operon promóter
lacZ:	β -galaktozidáz gén 5' vége (lacZa gén fragment)
SV40 3' splice:	Simian Vírus 40 3' splice helye
SV40 poliA:	Simian Vírus 40 poliadenilációs helye
f1(-) ori:	f1 fonalas fág replikációs origója
SV 40 ori:	Simian Vírus 40 replikációs origója

2. és 3. ábrák:

Tet:	tetraciklin rezisztencia gén
oriV:	<i>E. coli</i> plazmidon kódolt replikációs origója
RP4mob:	plazmidmobilitásért felelős mob régió
rep:	<i>C. glutamicum</i> pGA1 plazmid plazmidon kódolt replikációs origója
per:	kópiaszám kontrolljáért felelős gén a PGA1-ből
lacZ-alfa:	β -galaktozidáz gén lacZ α gén fragmense (N-terminális)
lacZ-alfa':	A lacZ α gén fragmens 5' vége
'lacZ-alfa:	A lacZ α gén fragmens 3' vége
zwf:	zwf gén
opcA:	opcA gén
További rövidítések:	
ApaI:	ApaI restrikciós enzim hasítóhelye



BamHI:	BamHI restrikciós enzim hasítóhelye
ClaI:	ClaI restrikciós enzim hasítóhelye
EcoRI:	EcoRI restrikciós enzim hasítóhelye
HindIII:	HindIII restrikciós enzim hasítóhelye
MstII:	MstII restrikciós enzim hasítóhelye
NheI:	NheI restrikciós enzim hasítóhelye
NsiI:	NsiI restrikciós enzim hasítóhelye
SacI:	SacI restrikciós enzim hasítóhelye
SalI:	SalI restrikciós enzim hasítóhelye
SpeI:	SpeI restrikciós enzim hasítóhelye
SphI:	SphI restrikciós enzim hasítóhelye
SspI:	SspI restrikciós enzim hasítóhelye
XbaI	XbaI restrikciós enzim hasítóhelye

Példák

A következő példák szemléltetik a találmányt. Az alkalmazott molekuláris biológiai technikák, mint például a plazmid DNS izolálása, restrikciós enzimmel való kezelés, ligálások, az *E. coli* standard transzformálásának módszerei (hacsak másképp nem tűntetjük fel) Sambrook és munkatársainak művében [Molecular Cloning. Laboratóriumi kézikönyv Cold Spring Harbour Laboratories, USA, (1989)] megtalálhatók.

1. példa. A *Corynebacterium glutamicum* AS019 törzs génkönyvtárának előállítása

A *Corynebacterium glutamicum* AS019 törzsének génkönyvtárát [Yoshihama és munkatársai, Journal of Bacteriology, 162, 591-597 (1985)] λ Zap expressziós rendszerben [Short és munkatársai, Nucleic Acid Research, 16, 7583-7600 (1988)] állítottuk elő az O'Donohue [O'Donohue M. „*Corynebacterium glutamicum*”ból származó

négy gyakori aminosav bioszintéziséért felelős gén klónozása és molekuláris analízise" című Ph.D disszertációja, National University of Ireland, Galway (1997)] által leírt módon. λ Zap ExpressTM kitet a Stratagene-től (Stratagene, 11011 North Torrey Pines Rd., La Jolla, California 92037) szereztük be, és a gyártók instrukcióinak megfelelően használtuk őket. Az AS019-DNS-t Sau3A restrikciós enzimmel kezeltük, és BamHI kezelt defoszforilált λ Zap ExpressTM karokba ligáltuk.

2. példa. Az opcA és zwf gének klónozása és szekvenálása

1. A zwf próba előállítás

A zwf gén belső szakaszával komplementer, radioaktívan jelölt oligonukleotidot használtunk próbaként az AS019 λ Zap ExpressTM fent ismertetett könyvtárához. Az oligonukleotidot a zwf gén belső szekvenciájához illeszkedő degenerált PCR primerek alkalmazásával állítottuk elő. A zwf DNS fragmentumok PCR amplifikációjához a következő, degenerált nukleotid primereket terveztük:

zwf1: 5' ATY GAY CAC TAY YTS GGY AAR GA 3'

zwf2: 5' RAA WGG MAC RCC YKS CCA 3'

ahol: R=A+G; Y=C+T; W=A+T; M=A+C; S=G+C; K=T+G

A kapott PCR termék becsült mérete körülbelül 480 bázispár volt.

Az optimális PCR körülményeket az alábbiakban határoztuk meg:

35 ciklus

94°C 1 percig

60°C 1 percig

72°C 30 másodpercig

2,5-3,5 mM MgCl₂

100-150 ng AS019 genomiális DNS

A kapott PCR termék szekvencia-analízise megerősítette, hogy a termék a zwf gén belső részének felel meg. A szekvencia-analízist univerzális forward és reverz primerek valamint a Pharmacia Biotech-től (St. Albans, Herts, UK) származó T7 szekvenáló kit segítségével végeztük.

2. Klónozás

Az AS019 λ Zap ExpressTM könyvtár szekvenálását a λ Zap ExpressTM rendszer eljárási útmutatója (Stratagene, 11011 North Torrey Pines Rd., La Jolla, California 92037) szerint végeztük. Ezután az izolált klónokon Southern Blot analízist hajtottunk végre. A DNS Southern átvitele NytranTM [("Nytran, Modified Nylon-66 Membrane Filters" (1987. március), Schleicher és Schuell, Dassel, Németország] membrán felhasználásával Schleicher és Schuell receptje alapján történt. A korábban ismertetett primereket valamint PCR körülményeket használva előállított kétszálú DNS fragmenseket α -³²P-dCTP-vel radioaktívan jelöltük az Amersham Life Science-től származó (Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) MultipleTM DNS jelölő kit segítségével a gyártók útmutatásainak megfelelően. Az előhibridizációt, hibridizációt és a mosási körülményeket úgy állítottuk be, ahogy azt a Schleicher és Schuell kézikönyve előírja. Az autoradiográfiát Sambrook és munkatársainak kézikönyve szerint, AgFa Curix RPIL film felhasználásával végeztük. Így számos zwf klónt azonosítottunk. Az egyik klónból a plazmid DNS-t izoláltuk, elneveztük pBOB102 vektornak (1. ábra) és a további vizsgálatokat ezzel végeztük.

3. Szekvenálás



A pBOB102 klónozott inszertumát a Sanger-féle didezoxi láncterminációs módszerrel [Sanger és munkatársai, Proceedings of National Academy of Sciences USA 74, 5463-5467 (1977)] végeztük. A módszerhez T7 szekvenáló kitet és α -³⁵S-dCTP-t (Pharmacia Biotech, St. Albans, Herts, UK) alkalmaztunk. A mintákat 3-8 óráig 6%-os poliakrilamid/karbamid gélen TBE pufferben futtattuk konstans 50 mA áramerősséggel, a Pharmacia klónozó és szekvenáló kézikönyv előírásainak megfelelően ["T⁷ Sequencing™ Kit" ref. XY-010-00-19, Pharmacia Biotech, (1994)]. A kezdő szekvencia analízishez Pharmacia Biotech által előállított univerzális forward és M13 reverz primert használtunk:

Univerzális forward primer: 5' GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C 3'

M13 reverz primer: 5' GGA AAC AGC TAT GAC CAT G 3'

A kapott szekvenciából ezután olyan belső primereket terveztünk, amelyek lehetővé tették a teljes *opcA* gén levezetését. A belső primerek szekvenciái a következők:

1. számú belső primer: 5' TCA ACC CTG AGT CCA CC 3'
2. számú belső primer: 5' CTG ACC ACG AGC GGA GG 3'
3. számú belső primer: 5' ATG GTG ATC TGG ACG TG 3'
4. számú belső primer: 5' CTG GCG ACT TGG CTC GA 3'
5. számú belső primer: 5' CTT CCG GAT ACC ACC ACC 3'

A kapott DNS szekvenciát a Strider féle programmal [Marck, Nucleic Acid Research 16, 1829-1836 (1988)] 1.0 verziójával egy Apple Macintosh típusú számítógépen analizáltuk. Ez a program lehetővé teszi a restrikciós hely használat és a nyitott leolvasási keret analízisét valamint a kodon használat meghatározását. A kapott DNS szekvenciákat a BLAST program segítségével [Altschul és munkatársai, Nucleic Acid Research 25, 3389-3402 (1997)]

összehasonlítottuk azokkal, amelyek az EMBL és Genbank adatbázisokban találhatóak. A DNS és fehérje szekvenciák illesztését Clustal V és Clustal W programok [Higgins és Sharp, Gene 73, 237-244 (1988)] segítségével végeztük.

Az így kapott szekvenciát a 6. azonosítószámú szekvencia mutatja. A kapott nukleotidszekvencia analízise egy 957 bázispárnyi nyitott leolvasási keretet eredményezett, amelyet *opcA* génnek neveztünk el. Ez egy 319 aminosavból álló fehérjét kódol, amelyet a 8. és 10. azonosítószámú szekvenciákon mutatunk be. A *zwf* gént kódoló régiók szintén a 6. azonosítószámú szekvenciában láthatók. A *zwf* fehérje aminosav-sorrendjét, amely 514 aminosavat tartalmaz, a 7. azonosítószámú szekvencia mutatja be.

3. példa *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 törzsének genomialis kozmid alapú génkönyvtárának előállítás

A *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 törzsének kromoszómális DNS-ét Tauch és munkatársainak [Plasmid 33, 168-179 (1995)] módszerével izoláltuk és *Sau3AI* restrikciós enzimmel (Amersham Pharmacia, Freiburg, Németország, Termék leírás *Sau3AI*, kódszám: 27-0913-02) részlegesen emésztettük. A DNS fragmenseket alkalikus foszfátázzal (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Németország, Termék leírás: SAP, kódszám: 1758250) defoszforiláltuk. A SuperCos1 [Wahl és munkatársai, Proceedings of National Academy of Sciences USA 84, 2160-2164 (1987)] kozmid vektor DNS-ét, amely a Stratagene-től (La Jolla, USA, Termék leírás: SuperCos1 Cosmid Vector Kit, kódszám: 251301) származik, *XbaI* (Amersham Pharmacia, Freiburg, Németország, termék leírás: *XbaI*, kódszám: 27-0948-02) restrikciós enzimmel hasítottuk és hasonlóképpen alkalikus foszfátázzal kezel-

tük. Ezután a kozmid DNS-t BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Németország, termék leírás: BamHI, kódszám: 27-0868-04) restriktációs enzimmel hasítottuk. Az ily módon kezelt kozmid DNS-t összekevertük a kezelt ATCC13032 DNS-sel, és az egészet ezután T4 DNS ligázzal (Amersham Pharmacia, Freiburg, Németország, termék leírás: T4-DNS-ligáz, kódszám: 27-0870-04) kezeltük. A ligációs keveréket ezután fágokba csomagoltuk Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Termék leírás: Gigapack II XL Packing Extracts, kódszám: 200217). *E. coli* NM554 törzsének [Raleigh és munkatársai, Nucleic Acid Research 16, 1563-1575 (1988)] fertőzéséhez a sejteket 10 mM MgSO₄-ban vettük fel és összekevertük egységnyi fáguszuspenzióval. A fertőzést és a kozmid könyvtár titrálását a Sambrook és munkatársai [Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbour (1989)] által leírt módon végeztük, a sejteket 100 µg/ml ampicillint tartalmazó LB agarra [Lennox, Virology, 1, 190 (1955)] szélesztettük. Egy éjszakán át, 37°C-on történő inkubálást követően különálló rekombináns klónokat szelektáltunk.

4. példa. Az ATCC 13032 törzs opcA és zwf génjének izolálása és szekvenálása

Egy különálló telep kozmid DNS-ét Quiaprep Spin Miniprep Kit (termék száma: 27106, Quiagen, Hilden, Németország) segítségével a gyártók utasításainak megfelelően izoláltuk, és részlegesen Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Németország, termék leírás: Sau3AI, kódszám: 27-0913-02) restriktációs enzimmel emésztettük. A DNS fragmenseket defoszforiláltuk garnélarák alkalikus foszfatázzal (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Németország, Termék leírás: SAP, kódszám: 1758250).

Gélelektroforézissel történő szeparálás után az 1500-2000 bázispár méretű kozmid darabokat QuiaExII Gel Extraction Kit (Termék száma: 20021, Quiagen, Hilden, Németország) segítségével izoláltuk. Az Invitrogen-től származó pZero-1 DNS szekvenáló vektort (Groningen, Holland, Termék leírás: Zero Background Cloning Kit, kódszám: K2500-01) BamHI restrikciós enzimmel (Amersham Pharmacia, Freiburg, Németország, Termék leírás: BamHI, kódszám: 27-0868-04) hasítottuk. A kozmid darabok ligálását a pZero szekvenáló vektorban végeztük a Sambrook és munkatársai által leírt módon (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)]. A DNS elegyet egy éjen át T4 ligázzal (Pharmacia, Biotech, Freiburg, Németország) inkubáltuk. Ezt a ligációs keveréket azután elektroporációval [Tauch és munkatársai, FEMS Microbiological Letters, 123, 343-347 (1994)] *E. coli* DH5 α MCR törzsébe [Grant, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 87, 4645-4649 (1990)] juttattuk és 50 μ g/ml zeocint tartalmazó LB [Lennox, Virology 1, 190 (1955)] agarra szélesztettük. A rekombináns klónok plazmidjainak preparálását Biorobot 9600 (Termék szám: 900200, Quiagen, Hilden, Németország) segítségével végeztük. A szekvenálást a Sanger és munkatársai által javasolt [Proceedings of National Academy of Sciences, USA 74, 5463-5467 (1977)] didezoxi láncterminációs módszerrel hajtottuk végre követve a Zimmermann és munkatársai [Nucleic Acid Research, 18, 1067 (1990)] módosításait. Ehhez az PE Applied Biosystem-től származó "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit"-et (Termék szám: 403044, Weiterstet, Németország) használtuk. A gélelektroforézissel történő szeparációt és a szekvenáló reakció analízisét "Rotiphoresis NF

Acrylamide/Bisacrylamide" gélben (Termék szám: A124.1, Roth Karlsruhe, Németország) végeztük PE Applied Bioystems-től (Weiterstadt, Németország) származó szekvenáló készülékkel. A kapott nyers szekvenciaadatokat ezután a Staden programcsomag [Nucleic Acid Research 14, 217-231 (1986)] 97-0 verziójával dolgoztuk fel. A pZero1 származékok különálló szekvenciáit egy folytonos contigba gyűjtöttük össze. A számítógép által létrehozott kódoló régió analízisét a XNIP program [Staden, Nucleic Acid Research, 14, 217-231 (1986)] segítségével hajtottuk végre. További analíziseket a "BLAST kereső program" [Altschul és munkatársai, Nucleic Acid Research, 25, 3389-3402 (1997)] segítségével a National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) adatbázisát felhasználva végeztünk.

A kapott nukleotidszekvenciát az 1. azonosítószámú szekvencia mutatja. A nukleotidszekvencia elemzése egy 957 bázispárnyit kódoló régiót mutat, amelyet *opcA* génnek neveztünk el. Az *opcA* gén, beleértve stop kodonját is, a 4. azonosítószámú szekvencián látható. Az *opcA* gén kódolta 319 aminosavból álló szekvenciát a 3. és 5. azonosítószámú szekvenciák mutatják.

5. példa. *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 törzs glükóz-6-foszfát dehidrogenázának tisztítása és N-terminális szekvenálása

1. ATCC13032 törzs tenyésztése

A *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 glükóz-6-foszfát dehidrogenázának tisztításához a törzset aerob körülmények között, minimál táptalajon, 30°C-on Labfors fermentorban (Infors AG, Bottmingen, Switzerland) tenyésztettük. Az előkultúrát (Bacto® Brain Heart Infusion medium, Difco Laboratories, Detroit, USA) 15 órán át 30°C-on inkubáltuk és ezzel inokuláltunk 2,5

1 minimál táptalajt. A táptalaj az alábbi összetevőket tartalmazta (literenként): 10 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g KH_2PO_4 , 1 g K_2HPO_4 , 0,25 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 10 mg CaCl_2 , 0,2 mg biotin, 30 mg protokatekánsav, 1 mg $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 1 mg $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,1 mg $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 0,02 mg CuSO_4 , 0,002 mg $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 1,2 g HCl , 0,2 g polipropilén glikol, 75 mg tritriplex II és 100 g glükóz. A pH állandó 7,0 értéken tartása céljából a tenyészethez folyamatosan nátrium-hidroxidot adagoltunk. A sejteket növekedésük késő exponenciális szakaszáig tenyésztettük. 6400 g-n, 15 perces, 4°C-on történő centrifugálást [Avanti J-25 centrifuga, Beckman JA10 rotor (Fullerton, USA) felhasználásával] követően a sejteket 10 mM MgCl_2 -ot tartalmazó 100 mM TRIS-HCl (pH=7,5) pufferben mostuk, majd felhasználásig -20°C-on tároltuk.

2. Enzimmtisztítás

A Sejtek feltárását dezintegrátor rendszerrel (Disintegrator S, BIOMATIC, Rodgau-Hainhausen, Németország) végeztük. Ez előtt a sejteket 10 mM MgCl_2 -ot és 0,75 mM DTT-t és számos proteáz inhibitor (CompleteTM, Roche, Mannheim, Németország) tartalmazó 100 mM TRIS-HCl (pH=7,5) pufferben reszuszpendáltuk. A nedves sejtek teljes szuszpenzióhoz mért tömegarányát 0,3-re állítottuk be. 100 ml szuszpenzióként 100 ml üveggyöngy hozzáadása után, amelyek átmérője 0,1-0,25 mm volt (Fisher Scientific, Düsseldorf, Németország), a sejtek feltárását 12 percen át 5000 rpm fordulatszámmal értük el. A feltárás során a hőmérséklet emelkedését jégűtéssel akadályoztuk meg. Az üveggyöngyök eltávolítása után egy ultracentrifugálási lépés [L8-70M centrifuga, Ti45 rotor, Beckman (Fullerton, USA)] következett 235 000 g-n 90 percig, 4°C-on. A felülúszót nyers kivonatként használtuk a glükóz-6-

foszfát dehidrogenáz tisztításához. Minden tisztítási lépést egy Beckman (Fullerton, USA) Biosys2000 rendszerrel végeztünk.

A nyers kivonatot egy XK 50/30 oszlopra (Pharmacia, Freiburg, Németország), amely Fractogel EMD DEAE-650(S) töltet (Merck, Darmstadt) tartalmazott, rétegeztük. A teljes ágytérfor-
gat 500 ml volt. Az oszlopot előzőleg 30 mM $MgCl_2$ -t és 0,75 mM DTT-t tartalmazó 50 mM TRIS-HCl (pH=7,5) pufferral egyensúlyoz-
tuk ki. A nyers kivonat oszlopra rétegzése után az oszlopot ugyanezzel a pufferral mostuk át, de ez 144 mM KCl-ot is tartal-
mazott. Az elúciót 95 percig lineáris KCl gradiensben végeztük, amely 144 mM-től 320 mM-ig tartott. Az áramlási sebesség 7,4 ml/perc volt. Az aktív frakciót összegyűjtöttük, majd centriprep® 30 töményítők (Amicon, Beverly, USA) segítségével, Varifuge 3.0R centrifugát (Heraeus, Hanau, Németország) használ-
va 1500 g-n, 4°C-on töményítettük. 30 mM $MgCl_2$ -t és 0,75 mM DTT-t tartalmazó 50 mM TRIS-HCl pufferral való hígítással a koncentrá-
ciót 40 mM-ra állítottuk be. Ezután a részlegesen tisztított glükóz-6-foszfát dehidrogenázt 65 ml Red-Sepharose CL6B-t tar-
talmazó XK26/20 oszlopra (Pharmacia, Freiburg, Németország) ré-
tegeztük. Az oszlopot 30 mM $MgCl_2$ -t és 0,75 mM DTT-t tartalmazó 50 mM TRIS-HCl, pH=7,5, pufferral kalibráltuk. Az elúciót 590 percig lineáris (0-800 mM) KCl gradiensben, 0,87 ml/perc sebes-
séggel végeztük.

Az aktív glükóz-6-foszfát dehidrogenáz frakciók összegyűjté-
se után a KCl koncentrációt 10 mM-ra állítottuk be a fent emlí-
tett módon. Ezután az oldatot 20 ml 2'5'-ADP-sepharose mátrixot
tartalmazó XK16/20 oszlopra (Pharmacia, Freiburg, Németország)
vittük fel. A kalibrálást a Red-Sepharose oszlophoz hasonló mó-

don végeztük. Az oszlopot 0-2 mM NADP lineáris gradienssel eluáltuk. Az aktív glükóz-6-foszfát dehidrogenáz frakciókat összegyűjtöttük és gél filtrációs oszlopra rétegeztük.

A gélszűréshez 1,6 cm átmérőjű, 114 ml ágytérfogató Superdex G200pg oszlopot (Pharmacia, Freiburg, Németország) használtunk. Az elúciót 1 ml/perc áramlási sebességgel 30 mM $MgCl_2$ -t, 200 mM KCl-t és 0,75 mM DTT-t tartalmazó 50 mM TRIS-HCL pH=7,5 pufferral végeztük. Az aktív frakciókat összegyűjtöttük, majd centriprep® 30 (Amicon, Beverly, USA) segítségével töményítettük. A tisztított glükóz-6-foszfát dehidrogenáz oldathoz 50% (v/v) glicerint adtunk, és $-20^{\circ}C$ -on tároltuk.

Az egész tisztítási folyamat során a glükóz-6-foszfát dehidrogenáz aktivitását és a fehérje koncentrációját mértük.

A glükóz 6-foszfát dehidrogenáz aktivitásának meghatározásához alkalmazott vizsgálati rendszer 50 mM TRIS-HCl-t (pH=7,5), 10 mM $MgCl_2$ -t, 1 mM NADP-t és 200 mM kálium glutamátot tartalmazott. A reakciót 4 mM glükóz-6-foszfáttal indítottuk be, a NADPH képződését 340 nm-en az abszorbancia növekedésével követtük nyomon. A fehérjék koncentrációját spektrofotometriás úton Coomassie Brilliant Zöld festést [Stoscheck, Methods in Enzymology, 182, 50-68 (1990)] követően határoztuk meg. Standardként szarvasmarha szérum albuminját használtuk. Minden mérést UV-60 A fotométer (Shimadzu, Kyoto, Japán) segítségével végeztünk.

A glükóz-6-foszfát dehidrogenáz tisztaságát szakaszos, denaturáló SDS-gélelektroforézissel teszteltük Laemmli [Laemmli, U.K., Nature, 227, 680-685 (1970)] módszere alapján. A harmadik tisztítási lépés után 2'-5'-ADP szefaróz ligandum affinitás anyag se-



gítségével, két különböző fehérjét kaptunk: egy 60 és egy 30 kDa molekulatömegűt. Ez a két fehérje géliszűrési kromatográfiával nem volt szétválasztható. Ennek a készítménynek a specifikus aktivitását 213 U/mg fehérjének határoztuk meg.

3. N-terminális szekvenálás

A tisztított glükóz-6-foszfát dehidrogenáz N-terminális szekvenálását Edman [Edman és Begg, *European Journal of Biochemistry*, 1, 80-91 (1967)] módszerével végeztük Procise® Protein Sequencing System (Applied Biosystems, Foster City, USA) felhasználásával.

A 60 kDa molekulatömegű fehérje az alábbi N-terminális szekvenciával rendelkezik: Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Trp Xaa Asn Pro Leu Arg Asp. Ezt a 11. azonosítószámú szekvencia is mutatja.

A 30 kDa molekulatömegű fehérjére pedig a következő N-terminális szekvenciát kaptuk: Met Ile Phe Xaa Leu Pro Asp Xaa Xaa Xaa Gln Gln Ile Ser Lys. Ezt a 12. azonosítószámú szekvencia mutatja.

6. példa. A zwf és opcA gének klónozása pGEM T-vektorba

A *C. glutamicum* ATCC 13032 törzse teljes zwf és opcA génjét valamint a szomszédos upstream és downstream régiókat tartalmazó DNS fragmensek amplifikációját PCR-rel végeztük. A reakciókat az 1. és 6. azonosítószámú szekvenciákból tervezett oligonukleotid primerekkel hajtottuk végre. *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 törzséből a genomiális DNS-t Heery és Dunican [*Applied and Environmental Microbiology*, 59, 791-799 (1993)] módszere alapján izoláltuk. Ezt használtuk azután templátként. A következő primereket alkalmaztuk:



zwf forward primer: 5' AGA ATC AGC ACG CTG CAT CAG 3'

opcA reverz primer: 5' AGT ATG GTG CGC GTA CTA 3'

A PCR paraméterek a következők voltak:

35 ciklus

95°C 3 percen át

94°C 1 percen át

47°C 1 percen át

72°C 45 másodpercen át

2,5 mM MgCl₂

körülbelül 150-200 ng DNS templát.

A kapott PCR terméket a kereskedelemben hozzáférhető, Promega Corp.-től (pGEM-T Easy Vector System 1, katalógus szám: A1360, Promega, UK, Southampton) vásárolt pGEM-T vektorba klónoztuk gazdaként *E. coli* JM109 törzsét [Yanisch-Perron és munkatársai, Gene 33, 103-119 (1985)] használva.

7. példa. Az ingázó pEC-T18mob2 vektor előállítása

Az *E. coli* - *C. glutamicum* pEC-T18mob2 vektort a technika állása szerint állítottuk elő.

A vektor tartalmazza a pGA1 plazmid rep replikációs régióját, amelyben benne van a per replikációs effektor [US-A-5 175 108 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; Nesvera és munkatársai, Journal of Bacteriology, 179, 1525-1532 (1997)], a pAG1 plazmid [US-A-5 158 891 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; National Center of Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) génkönyvtára] tetraciklin rezisztenciáért felelős tetA(Z) génjét, a pMB1 plazmid [Sutcliffe, Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology 43, 77-90 (1979)] oriV replikációs régióját, a lac promótert is



tartalmazó lacZ α fragmentumot és egy sokszoros klónozó helyet (mcs) [Norrandér és munkatársai, *Gene* 26, 101-106 (1983)], valamint az RP4 [Simon és munkatársai, *Bio/Technology* 1, 784-791 (1983)] plazmid mob régióját.

Az így előállított plazmiddal *E. coli* DH5 α (Hanahan, In: *DNA cloning, A practical approach*. I. kötet, IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA) törzsét transzformáltuk. A plazmid hordozó sejteket 5mg/l tetraciklinnel kiegészített LB agaron való szélesztéssel (Sambrook és munkatársai, *Molecular cloning Laboratóriumi kézikönyv*, 2. kiadás, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) szelektáltuk. A transzformánsokból a plazmid DNS-t Quiagen-től származó QIAprep Spin Miniprep Kit segítségével izoláltuk, és EcoRI valamint HindIII enzimmel végzett emésztéssel és ezt követő agaróz gélelektroforézissel (0,8%) ellenőriztük.

A pEC-T18mob2-nek elnevezett plazmid a 2. ábrán látható. A plazmidot a Német Törzsgyűjteményben (DSMZ = Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Cellkulturen, Braunschweig, Németország) DSM 13244 számon *Escherichia coli* K-12 DH5 α /pEC-T18mob2 formájában helyeztük letétbe.

8. példa. Glükóz 6-foszfát-dehidrogenáz expressziója *Corynebacterium glutamicum*-ban.

A SphI/SalI fragmenszen zwf és opcA gént tartalmazó pGEM T vektorból (ld. 6. példa) izoláltuk a teljes zwf és opcA gént, majd *E. coli* - *C. glutamicum* pEC-T18mob2 (7. példa, 2. ábra) ingázó vektorának SphI/SalI helyére klónoztuk. Ez az ingázó vektor két SphI helyet tartalmaz. Az első a lacZ α sokszoros klónozó helyén, a másik a tetracikin rezisztencia génben található. Sze-



lekcióra ezért tetraciklint (Sigma Aldrich, PO Bo 2424, Wimborne, Dorset BH21 7YR, UK) alkalmaztunk, ugyanis ez esetben csak azok a klónok tudtak növekedni, amelyek a sértetlen tetraciklin rezisztencia gént hordozták. Ezt az új konstrukciót pECzwfopca-nak neveztük el (3. ábra). A SacI enzimmel (Boehringer Mannheim GmbH, Németország) történő restrikciós analízis a zwf és opca gének helyes orientációját mutatta a pEC-T18mob2 lac promótere után található lacZα génbe. Ezzel a konstrukcióval *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) törzsét transzformáltuk. Az elektrotranszformánsokat izopropil-tiogalaktopiranoziddal (IPTG) (1mM), 5-bróm-4-klór-3-indolil-galaktopiranoziddal (XGAL) (0,02%) és tetraciklinnel (5mg/l) kiegészített Luria agaron selektáltuk. Az agarlemezeket 48 óráig 30°C-on inkubáltuk. O'Gara és Dunican [Applied and Environmental Microbiology, 61, 4477-4479 (1995)] módszere alapján gyors plazmid preparálást végeztünk, és a SacI restrikcióval megerősítettük a kívánt klónok jelenlétét. Egy kiválasztott klónt ATCC13032/pECzwfopca-nak neveztünk el.

9. példa: Egy amplifikált opca génnel rendelkező aminosav termelők előállítás

A *Corynebacterium glutamicum* DSM5715 L-lizin termelő törzsét leírták az EP B 0 435 132 számú európai szabadalmi leírásban, a *Brevibacterium flavum* DSM5399 törzsét pedig az EP B 0 385 940 számú európai szabadalmi leírásban. Mindkét törzset letétbe helyezték a Német Törzsgyűjteményben (DSMZ, Deutsche Sammlung für Microorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Németország).

A DSM5715 és DSM5399 törzseket a pECzwfopca plazmiddal (8. példa) transzformáltuk a Liebl és munkatársai [FEMS Microbiology



Letters, 53, 299-303 (1989)] által leírt elektroprációs módszerrel. A transzformánsok szelekcióját 18,5 g/l agy-szív infúziós levest, 0,5 M szorbitot, 5 g/l Bacto-triptont, 2,5 g Bacto-élesztő kivonatot, 5 g/l NaCl-t és 18g/l Bacto-agart tartalmazó LBHIS lemezeken végeztük, amelyet 5 mg/l mennyiségű tetraciklinnel egészítettünk ki. Az inkubálás 33°C-on 2 napig tartott.

Az így kapott törzseket DSM5715/pECzwfopca-nak és DSM5399/pECzwfopca-nak neveztük el.

10. példa. L-treonin előállítás

A 9. példában leírt *C. glutamicum* DSM5399/pECzwfopca törzset treonin termeltetésére alkalmas táplevesben tenyésztettük, és a felülúszóból a treonin koncentrációt meghatároztuk.

Ezért a törzset először a megfelelő antibiotikumot tartalmazó agarlemezen (agy-szív kivonat agar 5 mg/l tetraciklinnel kiegészítve) 24 óráig 33°C-on inkubáltuk. Ebből az agar kultúrából kiindulva előtenyészetet készítettünk (10 ml tápközeg/100 ml üveglombik). Az előtenyészet elkészítéséhez CgIII komplex tápközeget használtunk.

Cg III tápközeg összetétele:

NaCl	2,5g/l
Bacto-pepton	10 g/l
Bacto-élesztő kivonat	10 g/l
Glükóz (külön autoklávozva)	2% (w/v)

A pH-t 7,4-re állítottuk be.

Ehhez 5 mg/l tetraciklint adtunk. Az előtenyésztést 16 órán át, 33°C-on, 240 rpm fordulatszámmal rázógépből végeztük. A tenyészetet az előtenyészetből készítettük oly módon, hogy a főte-



nyészet OD értékét (660 nm) 0,1-re állítottuk be. A főkultúra tenyésztéséhez MM tápközeget használtunk.

MM tápközeg

CSL (gabona pác)	5 g/l
MOPS (morfopropán-szulfonsav)	20g/l
Glükóz (külön autoklávozva)	50 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	25 g/l
KH ₂ PO ₄	0,1 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,0 g/l
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	10 mg/l
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	10 mg/l
MnSO ₄ x H ₂ O	5,0 mg/l
Biotin (sterilen szűrt)	0,3 mg/l
Tiamin x HCl (sterilen szűrt)	0,2 mg/l
L-leucin (sterilen szűrt)	0,1 g/l
CaCO ₃	25 g/l

A CSL, MOPS és a sóoldat pH értékét ammónia oldattal 7,0-re állítottuk be, majd autoklávoztuk. A steril szubsztrátokat és a vitamin oldatokat ezután adtuk a tápközeghez, csakúgy, mint a száraz állapotban autoklávozott CaCO₃-t.

A tenyésztést 100 ml-es terelőlemezes kúpalakú lombikban 10 ml-es térfogatban végeztük. Tetraciklint adtunk hozzá (5 mg/l). a tenyésztést 33°C-on 80%-os páratartalom mellett végeztük.

72 óra múlva 660 nm-en Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, München) segítségével meghatároztuk a tenyészet OD értékét. A képződött treonin mennyiségét az Eppendorf-BioTroniktól származó (Hamburg, Németország) aminosav analizátorral határoztuk meg, ioncserélő kromatográfia és poszt-kromatográfiás

derivatizálás segítségével ninhidrines kimutatással.

A kísérlet eredményeit az 1. Táblázat tartalmazza.

1. Táblázat

Törzs	OD	L-treonin (g/l)
DSM5399	12,3	0,74
DSM5399/pECzwfopCA	9,9	1,0

11. példa. L-lizin előállítása

A 9. példában leírt *C. glutamicum* DSM5715/pECzwfopCA törzset lizin termeltetésére alkalmas táplevesben tenyésztettük, és a felülúszóból a lizinkoncentrációt meghatároztuk.

Ezért a törzset először a megfelelő antibiotikumot tartalmazó agarlemezen (agy-szív kivonat agar 5 mg/l tetraciklinnel kiegészítve) 24 óráig 33°C-on inkubáltuk. Ebből az agar kultúrából kiindulva előtenyészetet készítettünk (10 ml médium/100 ml üveg-lombik). Az előtenyészet elkészítéséhez CgIII komplex tápközeget használtunk.

Cg III tápközege összetétele:

NaCl	2,5 g/l
Bacto-pepton	10 g/l
Bacto-élesztő kivonat	10 g/l
Glükóz (külön autoklávozva)	2% (w/v)

A pH-t 7,4-re állítottuk be.

Ehhez 5 mg/l tetraciklint adtunk. Az előtenyésztést 16 órán át, 33°C-on, 240 rpm fordulatszámmal rázógépből végeztük. A főtenyészetet az előtenyészetből készítettük oly módon, hogy a fő-



tenyészet OD értékét (660 nm) 0,1-re állítottuk be. A főkultúra tenyésztéséhez MM tápközeget használtunk.

MM tápközeg összetétele:

CSL (gabona pác)	5 g/l
MOPS (morfopropán-szulfonsav)	20 g/l
Glükóz (külön autoklávozva)	58 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	25 g/l
KH_2PO_4	0,1 g/l
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	1,0 g/l
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	10 mg/l
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	10 mg/l
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	5,0 mg/l
Biotin (sterilen szűrt)	0,3 mg/l
Tiamin x HCl (sterilen szűrt)	0,2 mg/l
L-leucin (sterilen szűrt)	0,1 g/l
CaCO_3	25 g/l

A CSL, MOPS és a sóoldat pH értékét ammónia oldattal 7,0-ra állítottuk be, majd autoklávoztuk. A steril szubsztrátokat és a vitamin oldatokat ezután adtuk a tápközeghez, csakúgy, mint a száraz állapotban autoklávozott CaCO_3 -t.

A tenyésztést 100 ml-es terelőlemez kúp alakú lombikban 10 ml-es térfogatban végeztük. Tetraciklint adtunk hozzá (5 mg/l). A tenyésztést 33°C-on 80%-os páratartalom mellett végeztük.

72 óra múlva 660 nm-en Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, Munich) segítségével meghatároztuk a tenyészet OD értékét. A képződött lizin mennyiségét az Eppendorf-BioTroniktól származó (Hamburg, Németország) aminosav analizátorral határoztuk meg, ioncserélő kromatográfia és poszt-kromatográfias derivatizálás



segítségével ninhidrin kimutatással.

A kísérlet eredményeit a 2. Táblázat tartalmazza.

2. Táblázat

Törzs	OD	L-lizin HCl (g/l)
DSM5715	10,8	16,0
DSM5715/pECzwfopCA	8,1	17,1

03.07.2000

PCT

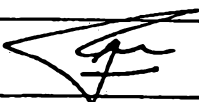
43

Original (for SUBMISSION) - printed on 03.07.2000 02:19:24 PM

990213 BT

0-1	Form - PCT/RO/134 (EASY) Indications Relating to Deposited Microorganism(s) or Other Biological Material (PCT Rule 13bis)	
0-1-1	Prepared using	PCT-EASY Version 2.90 (updated 08.03.2000)
0-2	International Application No.	
0-3	Applicant's or agent's file reference	990213 BT
1	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
1-1	page	18
1-2	line	24-30
1-3	Identification of Deposit	
1-3-1	Name of depositary institution	DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
1-3-2	Address of depositary institution	Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany
1-3-3	Date of deposit	26 January 2000 (26.01.2000)
1-3-4	Accession Number	DSMZ 13264
1-4	Additional Indications	NONE
1-5	Designated States for Which Indications are Made	all designated States
1-6	Separate Furnishing of Indications These indications will be submitted to the International Bureau later	NONE

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

0-4	This form was received with the international application: (yes or no)	yes
0-4-1	Authorized officer C.A.J.A. PASCHE	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

0-5	This form was received by the International Bureau on:	
0-5-1	Authorized officer	

Szekvencialista

<110> National University of Ireland, Galway
 Degussa-Hüls AG
 5 Forschungszentrum Juelich GmbH

 <120> OpcA gént kódoló nukleotidszekvenciák

 <130> 990213 BT
 10
 <140>
 <141>

 <160> 12
 15
 <170> PatentIn Ver. 2.1

 <210> 1
 <211> 6995
 20 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum ATCC13032

 <220>
 <221> CDS
 25 <222> (3658) .. (5202)
 <223> zwf

 <220>
 <221> CDS
 30 <222> (5217) .. (6173)
 <223> opcA

 <400> 1
 35 cacatttgaa ccacagttgg ttataaaatg ggttcaacat cactatggtt agaggtggtg 60
 acgggtcaga ttaagcaaag actactttcg gggtagatca cctttgccaa atttgaacca 120
 attaacctaa gtcgtagatc tgatcatcgg atctaacgaa aacgaaccaa aactttgggtc 180
 40 ccggtttaac ccaggaagga ttgaccacct tgacgctgtc acctgaactt caggcgctca 240
 ctgtacgcaa ttacccctct gattgggtccg atgtggacac caaggctgta gacactgttc 300
 gtgtcctcgc tgcagacgct gtagaaaact gtgggtccgg ccaccaggc accgcaatga 360
 45 gcttggtcc ccttgcatat accttgatc agcgggttat gaacgtagat ccacaggaca 420
 ccaactgggc aggccgtgac cgcttcgttc tttcttgttg ccaactcctt ttgacctagt 480
 50 acatccagct ttacttgggt ggattcggcc ttgagatgga tgacctgaag gctctgcgca 540
 cctgggattc cttgacccca ggacaccctg agtaccgcca caccaagggc gttgagatca 600
 ccactggccc tcttggccag ggtcttgcac ctgcagttgg tatggccatg gctgctcgtc 660
 55 gtgagcgtgg cctattcgac ccaaccgctg ctgagggcga atccccattc gaccaccaca 720
 tctacgtcat tgcttctgat ggtgacctgc aggaaggtgt cacctctgag gcatcctcca 780
 60 tcgctggcac ccagcagctg ggcaacctca tcgtgttctg ggatgacaac cgcattctcca 840
 tcgaagacaa cactgagatc gctttcaacg aggacgttgt tgctcggtac aaggcttacg 900

gctggcagac cattgaggtt gaggctggcg aggacgttgc agcaatcgaa gctgcagtgg 960
 ctgaggctaa gaaggacacc aagcgaccta ccttcacccg cgttcgcacc atcatcggct 1020
 5 tcccagctcc aactatgatg aacaccgggtg ctgtgcacgg tgctgctctt ggcgcagctg 1080
 aggttgacgc aaccaagact gagcttggat tcgacccgga ggctcacttc gcgatcgacg 1140
 10 atgaggttat cgctcacacc cgctccctcg cagagcgcg cgcacagaag aaggctgcat 1200
 ggcaggtcaa gttagatgag tgggcagctg ccaaccctga gaacaaggct ctgttcgatc 1260
 gcctgaactc ccgtgagctt ccagcgggct acgctgacga gctcccaaca tgggatgcag 1320
 15 atgagaaggg cgtcgcaact cgtaaggctt ccgaggctgc acttcaggca ctgggcaaga 1380
 cccttcctga gctgtggggc ggttcgctg acctcgcagg ttccaacaac accgtgatca 1440
 agggctcccc ttcttcggc cctgagcca tctccaccga gacctggtct gctgagcctt 1500
 20 acggccgtaa cctgcacttc ggtatccgtg agcacgctat gggatccatc ctcaacggca 1560
 ttccctcca cgggtggcacc cgccatacg gcggaacctt cctcatcttc tccgactaca 1620
 25 tgcgtcctgc agttcgtctt gcagctctca tggagaccga cgcttactac gtctggaccc 1680
 acgactccat cgggtctggc gaagatggcc caaccacca gcctgttgaa accttggtg 1740
 cactgcgcgc catcccaggt ctgtccgtcc tgcgtcctgc agatgcgaac gagaccgcc 1800
 30 aggcttgggc tgcagcactt gagtacaagg aaggccctaa gggctctgca ctgaccgcc 1860
 agaacgttcc tgttctggaa ggcaccaagg agaaggctgc tgaaggcgtt cgccgcggtg 1920
 35 gctacgtcct ggttgagggt tccaaggaaa cccagatgt gatcctcatg ggctccggct 1980
 ccgaggttca gcttgacgtt aacgctgcga aggctctgga agctgagggc gttgcagctc 2040
 gcgttgtttc cgttccttgc atggattggt tccaggagca ggacgcagag tacatcgagt 2100
 40 ccgttctgcc tgcagctgtg accgctcgtg tgtctgttga agctggcatc gcaatgcctt 2160
 ggtaccgctt cttgggcacc cagggccgtg ctgtctccct tgagcacttc ggtgcttctg 2220
 45 cggattacca gacctgttt gagaagttcg gcatcaccac cgatgcagtc gtggcagcgg 2280
 ccaaggactc cattaacggt taattgccct gctgttttta gcttcaaccg ggggcaatat 2340
 gattctccgg aattttattg ccccggttg ttgttgtaa tcggtacaaa gggctttaag 2400
 50 cacatccctt acttgctgc tctccttgag cacagttcaa gaacaattct tttaaggaaa 2460
 atttagtttc atgtctcaca ttgatgatct tgcacagctc ggcacttcca cttggctcga 2520
 55 cgacctctcc cgcgagcgca ttacttccgg caatctcagc caggttattg aggaaaagtc 2580
 tgtagtcggt gtcaccacca acccagctat ttctgcagca gcaatgtcca agggcgattc 2640
 ctacgacgct cagatcgag agctcaaggc cgctggcgca tctgttgacc aggtgttta 2700
 60 cgccatgagc atcgacgacg ttcgcaatgc ttgtgatctg ttcaccggca tcttcgagtc 2760
 ctccaacggc tacgacggcc gcgtgtccat cgaggttgac ccacgtatct ctgctgaccg 2820

cgacgcaacc ctggctcagg ccaaggagct gtgggcaaag gttgatcgtc caaacgtcat 2880
5 gatcaagatc cctgcaaccc caggttcttt gccagcaatc accgacgctt tggctgaggg 2940
catcagcgtt aacgtcacct tgatcttctc cggttgcgcg taccgcgagg tcatcgtgc 3000
gttcatcgag ggcataaagc aggtgctgc aaacggccac gacgtctcca agatccactc 3060
10 tgtggcttcc ttcttcgtct cccgcgtcga cggttgagatc gacaagcgcc tcgaggcaat 3120
cggatccgat gaggttttgg ctctgcgcgg caaggcaggc gttgccaacg ctgagcgcgc 3180
ttacgctgtg tacaaggagc ttttcgacgc cgccgagctg cctgaagggtg ccaacactca 3240
15 gcgcccactg tgggcatcca ccggcgtgaa gaacctgcg tacgctgcaa ctctttacgt 3300
ttccgagctg gctgggtcca acaccgtcaa caccatgcca gaaggacca tcgacgcggt 3360
20 tctggagcag ggcaacctgc acggtgacac cctgtccaac tccgcggcag aagctgacgc 3420
tgtgttctcc cagcttgagg ctctgggcgt tgacttggca gatgtcttcc aggtcctgga 3480
gaccgaggggt gtggacaagt tcgttgcttc ttggagcgaa ctgcttgagt ccatggaagc 3540
25 tcgctgaag tagaatcagc acgctgcac agtaacggcg acatgaaatc gaattagttc 3600
gatcttatgt ggccgttaca catctttcat taaagaaagg atcgtgacac taccatc 3657
30 gtg agc aca aac acg acc ccc tcc agc tgg aca aac cca ctg cgc gac 3705
Val Ser Thr Asn Thr Thr Pro Ser Ser Trp Thr Asn Pro Leu Arg Asp
1 5 10 15
ccg cag gat aaa cga ctc ccc cgc atc gct ggc cct tcc ggc atg gtg 3753
35 Pro Gln Asp Lys Arg Leu Pro Arg Ile Ala Gly Pro Ser Gly Met Val
20 25 30
atc ttc ggt gtc act ggc gac ttg gct cga aag aag ctg ctc ccc gcc 3801
40 Ile Phe Gly Val Thr Gly Asp Leu Ala Arg Lys Lys Leu Leu Pro Ala
35 40 45
att tat gat cta gca aac cgc gga ttg ctg ccc cca gga ttc tcg ttg 3849
Ile Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Gly Leu Leu Pro Pro Gly Phe Ser Leu
50 55 60
45 gta ggt tac ggc cgc cgc gaa tgg tcc aaa gaa gac ttt gaa aaa tac 3897
Val Gly Tyr Gly Arg Arg Glu Trp Ser Lys Glu Asp Phe Glu Lys Tyr
65 70 75 80

	gta	cgc	gat	gcc	gca	agt	gct	ggg	gct	cgt	acg	gaa	ttc	cgt	gaa	aat	3945
	Val	Arg	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Gly	Ala	Arg	Thr	Glu	Phe	Arg	Glu	Asn	
				85						90					95		
5	gtt	tgg	gag	cgc	ctc	gcc	gag	ggg	atg	gaa	ttt	gtt	cgc	ggc	aac	ttt	3993
	Val	Trp	Glu	Arg	Leu	Ala	Glu	Gly	Met	Glu	Phe	Val	Arg	Gly	Asn	Phe	
				100					105					110			
10	gat	gat	gat	gca	gct	ttc	gac	aac	ctc	gct	gca	aca	ctc	aag	cgc	atc	4041
	Asp	Asp	Asp	Ala	Ala	Phe	Asp	Asn	Leu	Ala	Ala	Thr	Leu	Lys	Arg	Ile	
				115				120					125				
15	gac	aaa	acc	cgc	ggc	acc	gcc	ggc	aac	tgg	gct	tac	tac	ctg	tcc	att	4089
	Asp	Lys	Thr	Arg	Gly	Thr	Ala	Gly	Asn	Trp	Ala	Tyr	Tyr	Leu	Ser	Ile	
		130					135					140					
20	cca	cca	gat	tcc	ttc	aca	gcg	gtc	tgc	cac	cag	ctg	gag	cgt	tcc	ggc	4137
	Pro	Pro	Asp	Ser	Phe	Thr	Ala	Val	Cys	His	Gln	Leu	Glu	Arg	Ser	Gly	
	145					150					155					160	
25	atg	gct	gaa	tcc	acc	gaa	gaa	gca	tgg	cgc	cgc	gtg	atc	atc	gag	aag	4185
	Met	Ala	Glu	Ser	Thr	Glu	Glu	Ala	Trp	Arg	Arg	Val	Ile	Ile	Glu	Lys	
					165					170					175		
30	cct	ttc	ggc	cac	aac	ctc	gaa	tcc	gca	cac	gag	ctc	aac	cag	ctg	gtc	4233
	Pro	Phe	Gly	His	Asn	Leu	Glu	Ser	Ala	His	Glu	Leu	Asn	Gln	Leu	Val	
				180					185					190			
35	aac	gca	gtc	ttc	cca	gaa	tct	tct	gtg	ttc	cgc	atc	gac	cac	tat	ttg	4281
	Asn	Ala	Val	Phe	Pro	Glu	Ser	Ser	Val	Phe	Arg	Ile	gac	His	Tyr	Leu	
			195					200					205				
40	ggc	aag	gaa	aca	gtt	caa	aac	atc	ctg	gct	ctg	cgt	ttt	gct	aac	cag	4329
	Gly	Lys	Glu	Thr	Val	Gln	Asn	Ile	Leu	Ala	Leu	Arg	Phe	Ala	Asn	Gln	
		210					215					220					
45	ctg	ttt	gag	cca	ctg	tgg	aac	tcc	aac	tac	gtt	gac	cac	gtc	cag	atc	4377
	Leu	Phe	Glu	Pro	Leu	Trp	Asn	Ser	Asn	Tyr	Val	Asp	His	Val	Gln	Ile	
	225				230					235					240		
50	acc	atg	gct	gaa	gat	att	ggc	ttg	ggg	gga	cgt	gct	ggg	tac	tac	gac	4425
	Thr	Met	Ala	Glu	Asp	Ile	Gly	Leu	Gly	Gly	Arg	Ala	Gly	Tyr	Tyr	Asp	
					245				250					255			
55	ggc	atc	ggc	gca	gcc	cgc	gac	gtc	atc	cag	aac	cac	ctg	atc	cag	ctc	4473
	Gly	Ile	Gly	Ala	Ala	Arg	Asp	Val	Ile	Gln	Asn	His	Leu	Ile	Gln	Leu	
				260				265						270			
50	ttg	gct	ctg	gtt	gcc	atg	gaa	gaa	cca	att	tct	ttc	gtg	cca	gcg	cag	4521
	Leu	Ala	Leu	Val	Ala	Met	Glu	Glu	Pro	Ile	Ser	Phe	Val	Pro	Ala	Gln	
				275				280					285				
55	ctg	cag	gca	gaa	aag	atc	aag	gtg	ctc	tct	gcg	aca	aag	ccg	tgc	tac	4569
	Leu	Gln	Ala	Glu	Lys	Ile	Lys	Val	Leu	Ser	Ala	Thr	Lys	Pro	Cys	Tyr	
		290					295					300					

5	cca ttg gat aaa acc tcc gct cgt ggt cag tac gct gcc ggt tgg cag Pro Leu Asp Lys Thr Ser Ala Arg Gly Gln Tyr Ala Ala' Gly Trp Gln 305 310 315 320	4617
10	ggc tct gag tta gtc aag gga ctt cgc gaa gaa gat ggc ttc aac cct Gly Ser Glu Leu Val Lys Gly Leu Arg Glu Glu Asp Gly Phe Asn Pro 325 330 335	4665
15	gag tcc acc act gag act ttt gcg gct tgt acc tta gag atc acg tct Glu Ser Thr Thr Glu Thr Phe Ala Ala Cys Thr Leu Glu Ile Thr Ser 340 345 350	4713
20	cgt cgc tgg gct ggt gtg ccg ttc tac ctg cgc acc ggt aag cgt ctt Arg Arg Trp Ala Gly Val Pro Phe Tyr Leu Arg Thr Gly Lys Arg Leu 355 360 365	4761
25	ggt cgc cgt gtt act gag att gcc gtg gtg ttt aaa gac gca cca cac Gly Arg Arg Val Thr Glu Ile Ala Val Val Phe Lys Asp Ala Pro His 370 375 380	4809
30	cag cct ttc gac ggc gac atg act gta tcc ctt ggc caa aac gcc atc Gln Pro Phe Asp Gly Asp Met Thr Val Ser Leu Gly Gln Asn Ala Ile 385 390 395 400	4857
35	gtg att cgc gtg cag cct gat gaa ggt gtg ctc atc cgc ttc ggt tcc Val Ile Arg Val Gln Pro Asp Glu Gly Val Leu Ile Arg Phe Gly Ser 405 410 415	4905
40	aag gtt cca ggt tct gcc atg gaa gtc cgt gac gtc aac atg gac ttc Lys Val Pro Gly Ser Ala Met Glu Val Arg Asp Val Asn Met Asp Phe 420 425 430	4953
45	tcc tac tca gaa tcc ttc act gaa gaa tca cct gaa gca tac gag cgc Ser Tyr Ser Glu Ser Phe Thr Glu Glu Ser Pro Glu Ala Tyr Glu Arg 435 440 445	5001
50	ctc att ttg gat gcg ctg tta gat gaa tcc agc ctc ttc cct acc aac Leu Ile Leu Asp Ala Leu Leu Asp Glu Ser Ser Leu Phe Pro Thr Asn 450 455 460	5049
55	gag gaa gtg gaa ctg agc tgg aag att ctg gat cca att ctt gaa gca Glu Glu Val Glu Leu Ser Trp Lys Ile Leu Asp Pro Ile Leu Glu Ala 465 470 475 480	5097
55	tgg gat gcc gat gga gaa cca gag gat tac cca gcg ggt acg tgg ggt Trp Asp Ala Asp Gly Glu Pro Glu Asp Tyr Pro Ala Gly Thr Trp Gly 485 490 495	5145
55	cca aag agc gct gat gaa atg ctt tcc cgc aac ggt cac acc tgg cgc Pro Lys Ser Ala Asp Glu Met Leu Ser Arg Asn Gly His Thr Trp Arg 500 505 510	5193
55	agg cca taa tttaggggca aaaa atg atc ttt gaa ctt ccg gat acc acc Arg Pro 515 Met Ile Phe Glu Leu Pro Asp Thr Thr 520	5243

5	acc cag caa att tcc aag acc cta act cga ctg cgt gaa tcg ggc acc Thr Gln Gln Ile Ser Lys Thr Leu Thr Arg Leu Arg Glu Ser Gly Thr 525 530 535 540	5291
10	cag gtc acc acc ggc cga gtg ctc acc ctc atc gtg gtc act gac tcc Gln Val Thr Thr Gly Arg Val Leu Thr Leu Ile Val Val Thr Asp Ser 545 550 555	5339
15	gaa agc gat gtc gct gca gtt acc gag tcc acc aat gaa gcc tcg cgc Glu Ser Asp Val Ala Ala Val Thr Glu Ser Thr Asn Glu Ala Ser Arg 560 565 570	5387
20	gag cac cca tct cgc gtg atc att ttg gtg gtt ggc gat aaa act gca Glu His Pro Ser Arg Val Ile Ile Leu Val Val Gly Asp Lys Thr Ala 575 580 585	5435
25	gaa aac aaa gtt gac gca gaa gtc cgt atc ggt ggc gac gct ggt gct Glu Asn Lys Val Asp Ala Glu Val Arg Ile Gly Gly Asp Ala Gly Ala 590 595 600	5483
30	tcc gag atg atc atc atg cat ctc aac gga cct gtc gct gac aag ctc Ser Glu Met Ile Ile Met His Leu Asn Gly Pro Val Ala Asp Lys Leu 605 610 615 620	5531
35	cag tat gtc gtc aca cca ctg ttg ctt cct gac acc ccc atc gtt gct Gln Tyr Val Val Thr Pro Leu Leu Leu Pro Asp Thr Pro Ile Val Ala 625 630 635	5579
40	tgg tgg cca ggt gaa tca cca aag aat cct tcc cag gac cca att gga Trp Trp Pro Gly Glu Ser Pro Lys Asn Pro Ser Gln Asp Pro Ile Gly 640 645 650	5627
45	cgc atc gca caa cga cgc atc act gat gct ttg tac gac cgt gat gac Arg Ile Ala Gln Arg Arg Ile Thr Asp Ala Leu Tyr Asp Arg Asp Asp 655 660 665	5675
50	gca cta gaa gat cgt gtt gag aac tat cac cca ggt gat acc gac atg Ala Leu Glu Asp Arg Val Glu Asn Tyr His Pro Gly Asp Thr Asp Met 670 675 680	5723
55	acg tgg gcg cgc ctt acc cag tgg cgg gga ctt gtt gcc tcc tca ttg Thr Trp Ala Arg Leu Thr Gln Trp Arg Gly Leu Val Ala Ser Ser Leu 685 690 695 700	5771
60	gat cac cca cca cac agc gaa atc act tcc gtg agg ctg acc ggt gca Asp His Pro Pro His Ser Glu Ile Thr Ser Val Arg Leu Thr Gly Ala 705 710 715	5819
65	agc ggc agt acc tcg gtg gat ttg gct gca ggc tgg ttg gcg cgg agg Ser Gly Ser Thr Ser Val Asp Leu Ala Ala Gly Trp Leu Ala Arg Arg 720 725 730	5867
70	ctg aaa gtg cct gtg atc cgc gag gtg aca gat gct ccc acc gtg cca Leu Lys Val Pro Val Ile Arg Glu Val Thr Asp Ala Pro Thr Val Pro 735 740 745	5915

acc gat gag ttt ggt act cca ctg ctg gct atc cag cgc ctg gag atc 5963
 Thr Asp Glu Phe Gly Thr Pro Leu Leu Ala Ile Gln Arg Leu Glu Ile
 750 755 760

5 gtt cgc acc acc ggc tcg atc atc atc acc atc tat gac gct cat acc 6011
 Val Arg Thr Thr Gly Ser Ile Ile Ile Thr Ile Tyr Asp Ala His Thr
 765 770 775 780

10 ctt cag gta gag atg ccg gaa tcc ggc aat gcc cca tcg ctg gtg gct 6059
 Leu Gln Val Glu Met Pro Glu Ser Gly Asn Ala Pro Ser Leu Val Ala
 785 790 795

15 att ggt cgt cga agt gag tcc gac tgc ttg tct gag gag ctt cgc cac 6107
 Ile Gly Arg Arg Ser Glu Ser Asp Cys Leu Ser Glu Glu Leu Arg His
 800 805 810

20 atg gat cca gat ttg ggc tac cag cac gca cta tcc ggc ttg tcc agc 6155
 Met Asp Pro Asp Leu Gly Tyr Gln His Ala Leu Ser Gly Leu Ser Ser
 815 820 825

gtc aag ctg gaa acc gtc taaggagaaa tacaacacta tggttgatgt 6203
 Val Lys Leu Glu Thr Val
 830

25 agtacgcgca cgcgatactg aagatttggt tgcacaggct gcctccaaat tcattgaggt 6263
 tgttgaagca gcaactgcc aataatggcac cgcacaggta gtgctcaccg gtgggtggcgc 6323

30 cggcatcaag ttgctggaaa agctcagcgt tgatgcggct gaccttgctt gggatcgcac 6383
 tcatgtgttc ttcggcgatg agcgcaatgt ccctgtcagt gattctgagt ccaatgaggg 6443

35 ccaggctcgt gaggcactgt tgtccaaggt ttctatccct gaagccaaca ttcacggata 6503
 tgggtctcggc gacgtagatc ttgcagaggc agcccgcgct tacgaagctg tgttgatga 6563

40 attcgacca aacggctttg atcttcacct gctcggcatg ggtggcgaag gccatatcaa 6623
 ctccctgttc cctcacaccg atgcagtcaa ggaatcctcc gcaaaggcca tcgcggtgtt 6683

45 tgattcccct aagcctcctt cagagcgtgc aactctaacc ctctctgcgg ttcactccgc 6743
 aaagcgcgtg tggttgctgg tttctggtgc ggagaaggct gaggcagctg cggcgatcgt 6803

50 caacgggtgag cctgctgttg agtggcctgc tgctggagct accggatctg aggaaacggg 6863
 attgttcttg gctgatgatg ctgcaggaaa tctctaagca gcgccagctc taacaagaag 6923

ctttaacaag aagctctaac gaaaagcact aacaaactaa tccgggtgcg aaccttcac 6983
 tgaatcgatg ga 6995

55 <210> 2
 <211> 514
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum ATCC13032

60 <400> 2
 Val Ser Thr Asn Thr Thr Pro Ser Ser Trp Thr Asn Pro Leu Arg Asp
 1 5 10 15



51

Pro Gln Asp Lys Arg Leu Pro Arg Ile Ala Gly Pro Ser Gly Met Val
20 25 30

Ile Phe Gly Val Thr Gly Asp Leu Ala Arg Lys Lys Leu Leu Pro Ala
35 40 45

5 Ile Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Gly Leu Leu Pro Pro Gly Phe Ser Leu
50 55 60

10 Val Gly Tyr Gly Arg Arg Glu Trp Ser Lys Glu Asp Phe Glu Lys Tyr
65 70 75 80

Val Arg Asp Ala Ala Ser Ala Gly Ala Arg Thr Glu Phe Arg Glu Asn
85 90 95

15 Val Trp Glu Arg Leu Ala Glu Gly Met Glu Phe Val Arg Gly Asn Phe
100 105 110

20 Asp Asp Asp Ala Ala Phe Asp Asn Leu Ala Ala Thr Leu Lys Arg Ile
115 120 125

Asp Lys Thr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Trp Ala Tyr Tyr Leu Ser Ile
130 135 140

25 Pro Pro Asp Ser Phe Thr Ala Val Cys His Gln Leu Glu Arg Ser Gly
145 150 155 160

Met Ala Glu Ser Thr Glu Glu Ala Trp Arg Arg Val Ile Ile Glu Lys
165 170 175

30 Pro Phe Gly His Asn Leu Glu Ser Ala His Glu Leu Asn Gln Leu Val
180 185 190

35 Asn Ala Val Phe Pro Glu Ser Ser Val Phe Arg Ile Asp His Tyr Leu
195 200 205

Gly Lys Glu Thr Val Gln Asn Ile Leu Ala Leu Arg Phe Ala Asn Gln
210 215 220

40 Leu Phe Glu Pro Leu Trp Asn Ser Asn Tyr Val Asp His Val Gln Ile
225 230 235 240

Thr Met Ala Glu Asp Ile Gly Leu Gly Gly Arg Ala Gly Tyr Tyr Asp
245 250 255

45 Gly Ile Gly Ala Ala Arg Asp Val Ile Gln Asn His Leu Ile Gln Leu
260 265 270

Leu Ala Leu Val Ala Met Glu Glu Pro Ile Ser Phe Val Pro Ala Gln
275 280 285

50 Leu Gln Ala Glu Lys Ile Lys Val Leu Ser Ala Thr Lys Pro Cys Tyr
290 295 300

Pro Leu Asp Lys Thr Ser Ala Arg Gly Gln Tyr Ala Ala Gly Trp Gln
 305 310 315 320
 5 Gly Ser Glu Leu Val Lys Gly Leu Arg Glu Glu Asp Gly Phe Asn Pro
 325 330 335
 Glu Ser Thr Thr Glu Thr Phe Ala Ala Cys Thr Leu Glu Ile Thr Ser
 340 345 350
 10 Arg Arg Trp Ala Gly Val Pro Phe Tyr Leu Arg Thr Gly Lys Arg Leu
 355 360 365
 15 Gly Arg Arg Val Thr Glu Ile Ala Val Val Phe Lys Asp Ala Pro His
 370 375 380
 Gln Pro Phe Asp Gly Asp Met Thr Val Ser Leu Gly Gln Asn Ala Ile
 385 390 395 400
 20 Val Ile Arg Val Gln Pro Asp Glu Gly Val Leu Ile Arg Phe Gly Ser
 405 410 415
 Lys Val Pro Gly Ser Ala Met Glu Val Arg Asp Val Asn Met Asp Phe
 420 425 430
 25 Ser Tyr Ser Glu Ser Phe Thr Glu Glu Ser Pro Glu Ala Tyr Glu Arg
 435 440 445
 30 Leu Ile Leu Asp Ala Leu Leu Asp Glu Ser Ser Leu Phe Pro Thr Asn
 450 455 460
 Glu Glu Val Glu Leu Ser Trp Lys Ile Leu Asp Pro Ile Leu Glu Ala
 465 470 475 480
 35 Trp Asp Ala Asp Gly Glu Pro Glu Asp Tyr Pro Ala Gly Thr Trp Gly
 485 490 495
 40 Pro Lys Ser Ala Asp Glu Met Leu Ser Arg Asn Gly His Thr Trp Arg
 500 505 510
 Arg Pro
 <210> 3
 45 <211> 319
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum ATCC13032
 <400> 3
 50 Met Ile Phe Glu Leu Pro Asp Thr Thr Thr Gln Gln Ile Ser Lys Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Arg Leu Arg Glu Ser Gly Thr Gln Val Thr Thr Gly Arg Val
 20 25 30
 55 Leu Thr Leu Ile Val Val Thr Asp Ser Glu Ser Asp Val Ala Ala Val
 35 40 45
 60 Thr Glu Ser Thr Asn Glu Ala Ser Arg Glu His Pro Ser Arg Val Ile
 50 55 60
 Ile Leu Val Val Gly Asp Lys Thr Ala Glu Asn Lys Val Asp Ala Glu

	65		70		75		80									
	Val	Arg	Ile	Gly	Gly	Asp	Ala	Gly	Ala	Ser	Glu	Met	Ile	Ile	Met	His
				85						90					95	
5	Leu	Asn	Gly	Pro	Val	Ala	Asp	Lys	Leu	Gln	Tyr	Val	Val	Thr	Pro	Leu
				100					105					110		
10	Leu	Leu	Pro	Asp	Thr	Pro	Ile	Val	Ala	Trp	Trp	Pro	Gly	Glu	Ser	Pro
			115					120					125			
	Lys	Asn	Pro	Ser	Gln	Asp	Pro	Ile	Gly	Arg	Ile	Ala	Gln	Arg	Arg	Ile
		130					135					140				
15	Thr	Asp	Ala	Leu	Tyr	Asp	Arg	Asp	Asp	Ala	Leu	Glu	Asp	Arg	Val	Glu
	145					150					155					160
	Asn	Tyr	His	Pro	Gly	Asp	Thr	Asp	Met	Thr	Trp	Ala	Arg	Leu	Thr	Gln
					165					170					175	
20	Trp	Arg	Gly	Leu	Val	Ala	Ser	Ser	Leu	Asp	His	Pro	Pro	His	Ser	Glu
				180					185					190		
	Ile	Thr	Ser	Val	Arg	Leu	Thr	Gly	Ala	Ser	Gly	Ser	Thr	Ser	Val	Asp
25			195					200					205			
	Leu	Ala	Ala	Gly	Trp	Leu	Ala	Arg	Arg	Leu	Lys	Val	Pro	Val	Ile	Arg
		210					215					220				
30	Glu	Val	Thr	Asp	Ala	Pro	Thr	Val	Pro	Thr	Asp	Glu	Phe	Gly	Thr	Pro
	225					230					235					240
	Leu	Leu	Ala	Ile	Gln	Arg	Leu	Glu	Ile	Val	Arg	Thr	Thr	Gly	Ser	Ile
				245					250						255	
35	Ile	Ile	Thr	Ile	Tyr	Asp	Ala	His	Thr	Leu	Gln	Val	Glu	Met	Pro	Glu
			260						265					270		
	Ser	Gly	Asn	Ala	Pro	Ser	Leu	Val	Ala	Ile	Gly	Arg	Arg	Ser	Glu	Ser
40			275					280					285			
	Asp	Cys	Leu	Ser	Glu	Glu	Leu	Arg	His	Met	Asp	Pro	Asp	Leu	Gly	Tyr
		290					295					300				
45	Gln	His	Ala	Leu	Ser	Gly	Leu	Ser	Ser	Val	Lys	Leu	Glu	Thr	Val	
	305					310					315					
50	<210> 4 <211> 960 <212> DNA <213> Corynebacterium glutamicum ATCC13032															
55	<220> <221> CDS <222> (1)..(957) <223> opcA															
60	<400> 4 atg atc ttt gaa ctt ccg gat acc acc acc cag caa att tcc aag acc 48 Met Ile Phe Glu Leu Pro Asp Thr Thr Thr Gln Gln Ile Ser Lys Thr 1 5 10 15															

	cta	act	cga	ctg	cgt	gaa	tcg	ggc	acc	cag	gtc	acc	acc	ggc	cga	gtg	96
	Leu	Thr	Arg	Leu	Arg	Glu	Ser	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Thr	Gly	Arg	Val	
				20					25					30			
5	ctc	acc	ctc	atc	gtg	gtc	act	gac	tcc	gaa	agc	gat	gtc	gct	gca	gtt	144
	Leu	Thr	Leu	Ile	Val	Val	Thr	Asp	Ser	Glu	Ser	Asp	Val	Ala	Ala	Val	
			35					40					45				
10	acc	gag	tcc	acc	aat	gaa	gcc	tcg	cgc	gag	cac	cca	tct	cgc	gtg	atc	192
	Thr	Glu	Ser	Thr	Asn	Glu	Ala	Ser	Arg	Glu	His	Pro	Ser	Arg	Val	Ile	
		50					55					60					
15	att	ttg	gtg	gtt	ggc	gat	aaa	act	gca	gaa	aac	aaa	gtt	gac	gca	gaa	240
	Ile	Leu	Val	Val	Gly	Asp	Lys	Thr	Ala	Glu	Asn	Lys	Val	Asp	Ala	Glu	
	65					70					75					80	
20	gtc	cgt	atc	ggt	ggc	gac	gct	ggt	gct	tcc	gag	atg	atc	atc	atg	cat	288
	Val	Arg	Ile	Gly	Gly	Asp	Ala	Gly	Ala	Ser	Glu	Met	Ile	Ile	Met	His	
					85					90					95		
25	ctc	aac	gga	cct	gtc	gct	gac	aag	ctc	cag	tat	gtc	gtc	aca	cca	ctg	336
	Leu	Asn	Gly	Pro	Val	Ala	Asp	Lys	Leu	Gln	Tyr	Val	Val	Thr	Pro	Leu	
				100					105					110			
30	ttg	ctt	cct	gac	acc	ccc	atc	gtt	gct	tgg	tgg	cca	ggt	gaa	tca	cca	384
	Leu	Leu	Pro	Asp	Thr	Pro	Ile	Val	Ala	Trp	Trp	Pro	Gly	Glu	Ser	Pro	
			115					120					125				
35	aag	aat	cct	tcc	cag	gac	cca	att	gga	cgc	atc	gca	caa	cga	cgc	atc	432
	Lys	Asn	Pro	Ser	Gln	Asp	Pro	Ile	Gly	Arg	Ile	Ala	Gln	Arg	Arg	Ile	
		130					135					140					
40	act	gat	gct	ttg	tac	gac	cgt	gat	gac	gca	cta	gaa	gat	cgt	gtt	gag	480
	Thr	Asp	Ala	Leu	Tyr	Asp	Arg	Asp	Asp	Ala	Leu	Glu	Asp	Arg	Val	Glu	
	145					150					155					160	
45	aac	tat	cac	cca	ggt	gat	acc	gac	atg	acg	tgg	gcg	cgc	ctt	acc	cag	528
	Asn	Tyr	His	Pro	Gly	Asp	Thr	Asp	Met	Thr	Trp	Ala	Arg	Leu	Thr	Gln	
					165					170					175		
50	tgg	cgg	gga	ctt	gtt	gcc	tcc	tca	ttg	gat	cac	cca	cca	cac	agc	gaa	576
	Trp	Arg	Gly	Leu	Val	Ala	Ser	Ser	Leu	Asp	His	Pro	Pro	His	Ser	Glu	
				180					185					190			
55	atc	act	tcc	gtg	agg	ctg	acc	ggt	gca	agc	ggc	agt	acc	tcg	gtg	gat	624
	Ile	Thr	Ser	Val	Arg	Leu	Thr	Gly	Ala	Ser	Gly	Ser	Thr	Ser	Val	Asp	
			195					200					205				

5	ttg gct gca ggc tgg ttg gcg cgg agg ctg aaa gtg cct gtg atc cgc Leu Ala Ala Gly Trp Leu Ala Arg Arg Leu Lys Val Pro Val Ile Arg 210 215 220	672	
10	gag gtg aca gat gct ccc acc gtg cca acc gat gag ttt ggt act cca Glu Val Thr Asp Ala Pro Thr Val Pro Thr Asp Glu Phe Gly Thr Pro 225 230 235 240	720	
15	ctg ctg gct atc cag cgc ctg gag atc gtt cgc acc acc ggc tcg atc Leu Leu Ala Ile Gln Arg Leu Glu Ile Val Arg Thr Thr Gly Ser Ile 245 250 255	768	
20	atc atc acc atc tat gac gct cat acc ctt cag gta gag atg ccg gaa Ile Ile Thr Ile Tyr Asp Ala His Thr Leu Gln Val Glu Met Pro Glu 260 265 270	816	
25	tcc ggc aat gcc cca tcg ctg gtg gct att ggt cgt cga agt gag tcc Ser Gly Asn Ala Pro Ser Leu Val Ala Ile Gly Arg Arg Ser Glu Ser 275 280 285	864	
30	gac tgc ttg tct gag gag ctt cgc cac atg gat cca gat ttg ggc tac Asp Cys Leu Ser Glu Glu Leu Arg His Met Asp Pro Asp Leu Gly Tyr 290 295 300	912	
35	cag cac gca cta tcc ggc ttg tcc agc gtc aag ctg gaa acc gtc taa Gln His Ala Leu Ser Gly Leu Ser Ser Val Lys Leu Glu Thr Val 305 310 315	960	
40	<210> 5		
45	<211> 319		
50	<212> PRT		
55	<213> Corynebacterium glutamicum ATCC13032		
60	<400> 5		
65	Met Ile Phe Glu Leu Pro Asp Thr Thr Thr Gln Gln Ile Ser Lys Thr 1 5 10 15		
70	Leu Thr Arg Leu Arg Glu Ser Gly Thr Gln Val Thr Thr Gly Arg Val 20 25 30		
75	Leu Thr Leu Ile Val Val Thr Asp Ser Glu Ser Asp Val Ala Ala Val 35 40 45		
80	Thr Glu Ser Thr Asn Glu Ala Ser Arg Glu His Pro Ser Arg Val Ile 50 55 60		
85	Ile Leu Val Val Gly Asp Lys Thr Ala Glu Asn Lys Val Asp Ala Glu 65 70 75 80		
90	Val Arg Ile Gly Gly Asp Ala Gly Ala Ser Glu Met Ile Ile Met His 85 90 95		
95	Leu Asn Gly Pro Val Ala Asp Lys Leu Gln Tyr Val Val Thr Pro Leu 100 105 110		
100	Leu Leu Pro Asp Thr Pro Ile Val Ala Trp Trp Pro Gly Glu Ser Pro 115 120 125		
105	Lys Asn Pro Ser Gln Asp Pro Ile Gly Arg Ile Ala Gln Arg Arg Ile 130 135 140		

Thr Asp Ala Leu Tyr Asp Arg Asp Asp Ala Leu Glu Asp Arg Val Glu
 145 150 155 160
 5 Asn Tyr His Pro Gly Asp Thr Asp Met Thr Trp Ala Arg Leu Thr Gln
 165 170 175
 Trp Arg Gly Leu Val Ala Ser Ser Leu Asp His Pro Pro His Ser Glu
 180 185 190
 10 Ile Thr Ser Val Arg Leu Thr Gly Ala Ser Gly Ser Thr Ser Val Asp
 195 200 205
 Leu Ala Ala Gly Trp Leu Ala Arg Arg Leu Lys Val Pro Val Ile Arg
 210 215 220
 15 Glu Val Thr Asp Ala Pro Thr Val Pro Thr Asp Glu Phe Gly Thr Pro
 225 230 235 240
 20 Leu Leu Ala Ile Gln Arg Leu Glu Ile Val Arg Thr Thr Gly Ser Ile
 245 250 255
 Ile Ile Thr Ile Tyr Asp Ala His Thr Leu Gln Val Glu Met Pro Glu
 260 265 270
 25 Ser Gly Asn Ala Pro Ser Leu Val Ala Ile Gly Arg Arg Ser Glu Ser
 275 280 285
 Asp Cys Leu Ser Glu Glu Leu Arg His Met Asp Pro Asp Leu Gly Tyr
 290 295 300
 30 Gln His Ala Leu Ser Gly Leu Ser Ser Val Lys Leu Glu Thr Val
 305 310 315
 35
 <210> 6
 <211> 3038
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum AS019
 40
 <220>
 <221> CDS
 <222> (115)..(1659)
 <223> zwf
 45
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1672)..(2628)
 <223> opcA
 50
 <400> 6
 cctgaagtag aatcagcacg ctgcatcagt aacggcgaca tgaaatcgaa ttagttcgat 60

	cttatgtggc	cgttacacat	ctttcattaa	agaaaggatc	gtgacactac	catc	gtg	117
							Val 1	
	agc	aca	aac	acg	acc	ccc	tcc	165
	Ser	Thr	Asn	Thr	Thr	Pro	Ser	
				5			10	
	cag	gat	aaa	cga	ctc	ccc	cgc	213
	Gln	Asp	Lys	Arg	Leu	Pro	Arg	
			20				25	
	ttc	ggt	gtc	act	ggc	gac	ttg	261
	Phe	Gly	Val	Thr	Gly	Asp	Leu	
		35				40	45	
	tat	gat	cta	gca	aac	cgc	gga	309
	Tyr	Asp	Leu	Ala	Asn	Arg	Gly	
		50				55	60	
0	ggt	tac	ggc	cgc	cgc	gaa	tgg	357
	Gly	Tyr	Gly	Arg	Arg	Glu	Trp	
				70			75	
25	cgc	gat	gcc	gca	agt	gct	ggt	405
	Arg	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Gly	
				85			90	
30	tgg	gag	cgc	ctc	gcc	gag	ggt	453
	Trp	Glu	Arg	Leu	Ala	Glu	Gly	
			100				105	
	gat	gat	gca	gct	ttc	gac	aac	501
	Asp	Asp	Ala	Ala	Phe	Asp	Asn	
35		115					120	
	aaa	acc	cgc	ggc	acc	gcc	ggc	549
	Lys	Thr	Arg	Gly	Thr	Ala	Gly	
		130					135	
40	cca	gat	tcc	ttc	aca	gcg	gtc	597
	Pro	Asp	Ser	Phe	Thr	Ala	Val	
					150		155	
45	gct	gaa	tcc	acc	gaa	gaa	gca	645
	Ala	Glu	Ser	Thr	Glu	Glu	Ala	
				165			170	
50	ttc	ggc	cac	aac	ctc	gaa	tcc	693
	Phe	Gly	His	Asn	Leu	Glu	Ser	
			180				185	
	gca	gtc	ttc	cca	gaa	tct	tct	741
	Ala	Val	Phe	Pro	Glu	Ser	Ser	
55		195					200	
	aag	gaa	aca	gtt	caa	aac	atc	789
	Lys	Glu	Thr	Val	Gln	Asn	Ile	
		210					215	
60	ttt	gag	cca	ctg	tgg	aac	tcc	837
	Phe	Glu	Pro	Leu	Trp	Asn	Ser	
					230		235	

5	atg gct gaa gat att ggc ttg ggt gga cgt gct ggt tac tac gac ggc Met Ala Glu Asp Ile Gly Leu Gly Gly Arg Ala Gly Tyr Tyr Asp Gly	885
	245 250 255	
10	atc ggc gca ccg cgc gac gtc atc cag aac cac ctg atc cag ctc ttg Ile Gly Ala Pro Arg Asp Val Ile Gln Asn His Leu Ile Gln Leu Leu	933
	260 265 270	
15	gct ctg gtt gcc atg gaa gaa cca att tct ttc gtg cca gcg gca cgg Ala Leu Val Ala Met Glu Glu Pro Ile Ser Phe Val Pro Ala Ala Arg	981
	275 280 285	
20	cag gca gaa aag atc aag gtg ctc tct gcg aca aag ccg tgc tac cca Gln Ala Glu Lys Ile Lys Val Leu Ser Ala Thr Lys Pro Cys Tyr Pro	1029
	290 295 300 305	
25	ttg gat aaa acc tcc gct cgt ggt cag tac gct gcc ggt tgg cag ggc Leu Asp Lys Thr Ser Ala Arg Gly Gln Tyr Ala Ala Gly Trp Gln Gly	1077
	310 315 320	
30	tct gag tta gtc aag gga ctt cgc gaa gaa gat ggc ttc aac cct gag Ser Glu Leu Val Lys Gly Leu Arg Glu Glu Asp Gly Phe Asn Pro Glu	1125
	325 330 335	
35	tcc acc act gag act ttt gcg gct tgt acc tta gag atc acg tct cgt Ser Thr Thr Glu Thr Phe Ala Ala Cys Thr Leu Glu Ile Thr Ser Arg	1173
	340 345 350	
40	cgc tgg gct ggt gtg ccg ttc tac ctg cgc acc ggt aag cgt ctt ggt Arg Trp Ala Gly Val Pro Phe Tyr Leu Arg Thr Gly Lys Arg Leu Gly	1221
	355 360 365	
45	cgc cgt gtt act gag att gcc gtg gtg ttt aaa gac gca cca cac cag Arg Arg Val Thr Glu Ile Ala Val Val Phe Lys Asp Ala Pro His Gln	1269
	370 375 380 385	
50	cct ttc gac ggc gac atg act gta tcc ctt ggc caa aac gcc atc gtg Pro Phe Asp Gly Asp Met Thr Val Ser Leu Gly Gln Asn Ala Ile Val	1317
	390 395 400	
55	att cgc gtg cag cct gat gaa ggt gtg ctc atc cgc ttc ggt tcc aag Ile Arg Val Gln Pro Asp Glu Gly Val Leu Ile Arg Phe Gly Ser Lys	1365
	405 410 415	
60	gtt cca ggt tct gcc atg gaa gtc cgt gac gtc aac atg gac ttc tcc Val Pro Gly Ser Ala Met Glu Val Arg Asp Val Asn Met Asp Phe Ser	1413
	420 425 430	
65	tac tca gaa tcc ttc act gaa gaa tca cct gaa gca tac gag cgc ctc Tyr Ser Glu Ser Phe Thr Glu Glu Ser Pro Glu Ala Tyr Glu Arg Leu	1461
	435 440 445	

att ttg gat gcg ctg tta gat gaa tcc agc ctc ttc cct acc aac gag 1509
 Ile Leu Asp Ala Leu Leu Asp Glu Ser Ser Leu Phe Pro Thr Asn Glu
 450 455 460 465
 5
 gaa gtg gaa ctg agc tgg aag att ctg gat cca att ctt gaa gca tgg 1557
 Glu Val Glu Leu Ser Trp Lys Ile Leu Asp Pro Ile Leu Glu Ala Trp
 470 475 480
 10
 gat gcc gat gga gaa cca gag gat tac cca gcg ggt acg tgg ggt cca 1605
 Asp Ala Asp Gly Glu Pro Glu Asp Tyr Pro Ala Gly Thr Trp Gly Pro
 485 490 495
 15
 aag agc gct gat gaa atg ctt tcc cgc aac ggt cac acc tgg cgc agg 1653
 Lys Ser Ala Asp Glu Met Leu Ser Arg Asn Gly His Thr Trp Arg Arg
 500 505 510
 20
 cca taa tttaggggca aa atg atc ttt gaa ctt ccg gat acc acc acc cag 1704
 Pro Met Ile Phe Glu Leu Pro Asp Thr Thr Thr Gln
 515 520 525
 25
 caa att tcc aag acc cta act cga ctg cgt gaa tcg ggc acc cag gtc 1752
 Gln Ile Ser Lys Thr Leu Thr Arg Leu Arg Glu Ser Gly Thr Gln Val
 530 535 540
 30
 acc acc ggc cga gtg ctc acc ctc atc gtg gtc act gac tcc gaa agc 1800
 Thr Thr Gly Arg Val Leu Thr Leu Ile Val Val Thr Asp Ser Glu Ser
 545 550 555
 35
 gat gtc gct gca gtt acc gag tcc acc aat gaa gcc tcg cgc gag cac 1848
 Asp Val Ala Ala Val Thr Glu Ser Thr Asn Glu Ala Ser Arg Glu His
 560 565 570
 40
 cca tct cgc gtg atc att ttg gtg gtt ggc gat aaa act gca gaa aac 1896
 Pro Ser Arg Val Ile Ile Leu Val Val Gly Asp Lys Thr Ala Glu Asn
 575 580 585 590
 45
 aaa gtt gac gca gaa gtc cgt atc ggt ggc gac gct ggt gct tcc gag 1944
 Lys Val Asp Ala Glu Val Arg Ile Gly Gly Asp Ala Gly Ala Ser Glu
 595 600 605
 50
 atg atc atc atg cat ctc aac gga cct gtc gct gac aag ctc cag tat 1992
 Met Ile Ile Met His Leu Asn Gly Pro Val Ala Asp Lys Leu Gln Tyr
 610 615 620
 55
 gtc gtc aca cca ctg ttg ctt cct gac acc ccc atc gtt gct tgg tgg 2040
 Val Val Thr Pro Leu Leu Leu Pro Asp Thr Pro Ile Val Ala Trp Trp
 625 630 635
 60
 cca ggt gaa tca cca aag aat cct tcc cag gac cca att gga cgc atc 2088
 Pro Gly Glu Ser Pro Lys Asn Pro Ser Gln Asp Pro Ile Gly Arg Ile
 640 645 650
 65
 gca caa cga cgc atc act gat gct ttg tac gac cgt gat gac gca cta 2136
 Ala Gln Arg Arg Ile Thr Asp Ala Leu Tyr Asp Arg Asp Ala Leu
 655 660 665 670

	gaa gat cgt gtt gag aac tat cac cca ggt gat acc gac atg acg tgg	2184
	Glu Asp Arg Val Glu Asn Tyr His Pro Gly Asp Thr Asp Met Thr Trp	
	675 680 685	
5	gcg cgc ctt acc cag tgg cgg gga ctt gtt gcc tcc tca ttg gat cac	2232
	Ala Arg Leu Thr Gln Trp Arg Gly Leu Val Ala Ser Ser Leu Asp His	
	690 695 700	
10	cca cca cac agc gaa atc act tcc gtg agg ctg acc ggt gca agc ggc	2280
	Pro Pro His Ser Glu Ile Thr Ser Val Arg Leu Thr Gly Ala Ser Gly	
	705 710 715	
15	agt acc tcg gtg gat ttg gct gca ggc tgg ttg gcg cgg agg ctg aaa	2328
	Ser Thr Ser Val Asp Leu Ala Ala Gly Trp Leu Pro Arg Arg Leu Lys	
	720 725 730	
20	gtg cct gtg atc cgc gag gtg aca gat gct ccc acc gtg cca acc gat	2376
	Val Pro Val Ile Arg Glu Val Thr Asp Ala Pro Thr Val Pro Thr Asp	
	735 740 745 750	
25	gag ttt ggt act cca ctg ctg gct atc cag cgc ctg gag atc gtt cgc	2424
	Glu Phe Gly Thr Pro Leu Leu Ala Ile Gln Arg Leu Glu Ile Val Arg	
	755 760 765	
30	acc acc ggc tcg atc atc atc acc atc tat gac gct cat acc ctt cag	2472
	Thr Thr Gly Ser Ile Ile Ile Thr Ile Tyr Asp Ala His Thr Leu Gln	
	770 775 780	
35	gta gag atg ccg gaa tcc ggc aat gcc cca tcg ctg gtg gct att ggt	2520
	Val Glu Met Pro Glu Ser Gly Asn Ala Pro Ser Leu Val Ala Ile Gly	
	785 790 795	
40	cgt cga agt gag tcc gac tgc ttg tct gag gag ctt cgc cac atg gat	2568
	Arg Arg Ser Glu Ser Asp Cys Leu Ser Glu Glu Leu Arg His Met Asp	
	800 805 810	
45	cca gat ttg ggc tac cag cac gca cta tcc ggc ttg tcc agc gtc aag	2616
	Pro Asp Leu Gly Tyr Gln His Ala Leu Ser Gly Leu Ser Ser Val Lys	
	815 820 825 830	
50	ctg gaa acc gtc taaggagaaa tacaacacta tggttgatgt agtacgcgca	2668
	Leu Glu Thr Val	
55	cgcatactga agatttggtt gcacaggctg cctccaaatt cattgagggtt gttgaagcag	2728
	caactgccaa taatggcacc gcacaggtag tgctcaccgg tggtaggcgcc ggcattcaagt	2788
	tgctggaaaa gctcagcggtt gatgcggctg accttgacctg ggatcgcat catgtgttct	2848
	tcggcgatga gcgcaatgtc cctgtcagtg attctgagtc caatgagggc caggctcgtg	2908
	aggcactggt gtccaagggt tctatccctg aagccaacat tcacggatat ggtctcggcg	2968
60	acgtagatct tgcagaggca gcccgcgctt acgaagctgt gttggatgaa ttcgcaccaa	3028
	acggcctttga	3038
60	<210> 7	
	<211> 514	
	<212> PRT	
	<213> Corynebacterium glutamicum AS019	

29454

7

<400> 7
 Val Ser Thr Asn Thr Thr Pro Ser Ser Trp Thr Asn Pro Leu Arg Asp
 1 5 10 15
 5 Pro Gln Asp Lys Arg Leu Pro Arg Ile Ala Gly Pro Ser Gly Met Val
 20 25 30
 10 Ile Phe Gly Val Thr Gly Asp Leu Ala Arg Lys Lys Leu Leu Pro Ala
 35 40 45
 Ile Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Gly Leu Leu Pro Pro Gly Phe Ser Leu
 50 55 60
 15 Val Gly Tyr Gly Arg Arg Glu Trp Ser Lys Glu Asp Phe Glu Lys Tyr
 65 70 75 80
 Val Arg Asp Ala Ala Ser Ala Gly Ala Arg Thr Glu Phe Arg Glu Asn
 85 90 95
 20 Val Trp Glu Arg Leu Ala Glu Gly Met Glu Phe Val Arg Gly Asn Phe
 100 105 110
 25 Asp Asp Asp Ala Ala Phe Asp Asn Leu Ala Ala Thr Leu Lys Arg Ile
 115 120 125
 Asp Lys Thr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Trp Ala Tyr Tyr Leu Ser Ile
 130 135 140
 30 Pro Pro Asp Ser Phe Thr Ala Val Cys His Gln Leu Glu Arg Ser Gly
 145 150 155 160
 Met Ala Glu Ser Thr Glu Glu Ala Trp Arg Arg Val Ile Ile Glu Lys
 165 170 175
 35 Pro Phe Gly His Asn Leu Glu Ser Ala His Glu Leu Asn Gln Leu Val
 180 185 190
 40 Asn Ala Val Phe Pro Glu Ser Ser Val Phe Arg Ile Asp His Tyr Leu
 195 200 205
 Gly Lys Glu Thr Val Gln Asn Ile Leu Ala Leu Arg Phe Ala Asn Gln
 210 215 220
 45 Leu Phe Glu Pro Leu Trp Asn Ser Asn Tyr Val Asp His Val Gln Ile
 225 230 235 240
 Thr Met Ala Glu Asp Ile Gly Leu Gly Gly Arg Ala Gly Tyr Tyr Asp
 245 250 255
 50 Gly Ile Gly Ala Pro Arg Asp Val Ile Gln Asn His Leu Ile Gln Leu
 260 265 270
 55 Leu Ala Leu Val Ala Met Glu Glu Pro Ile Ser Phe Val Pro Ala Ala
 275 280 285
 Arg Gln Ala Glu Lys Ile Lys Val Leu Ser Ala Thr Lys Pro Cys Tyr
 290 295 300
 60 Pro Leu Asp Lys Thr Ser Ala Arg Gly Gln Tyr Ala Ala Gly Trp Gln
 305 310 315 320
 Gly Ser Glu Leu Val Lys Gly Leu Arg Glu Glu Asp Gly Phe Asn Pro

325 330 335

5 Glu Ser Thr Thr Glu Thr Phe Ala Ala Cys Thr Leu Glu Ile Thr Ser
340 345 350

Arg Arg Trp Ala Gly Val Pro Phe Tyr Leu Arg Thr Gly Lys Arg Leu
355 360 365

10 Gly Arg Arg Val Thr Glu Ile Ala Val Val Phe Lys Asp Ala Pro His
370 375 380

Gln Pro Phe Asp Gly Asp Met Thr Val Ser Leu Gly Gln Asn Ala Ile
385 390 395 400

15 Val Ile Arg Val Gln Pro Asp Glu Gly Val Leu Ile Arg Phe Gly Ser
405 410 415

Lys Val Pro Gly Ser Ala Met Glu Val Arg Asp Val Asn Met Asp Phe
420 425 430

20 Ser Tyr Ser Glu Ser Phe Thr Glu Glu Ser Pro Glu Ala Tyr Glu Arg
435 440 445

25 Leu Ile Leu Asp Ala Leu Leu Asp Glu Ser Ser Leu Phe Pro Thr Asn
450 455 460

Glu Glu Val Glu Leu Ser Trp Lys Ile Leu Asp Pro Ile Leu Glu Ala
465 470 475 480

30 Trp Asp Ala Asp Gly Glu Pro Glu Asp Tyr Pro Ala Gly Thr Trp Gly
485 490 495

Pro Lys Ser Ala Asp Glu Met Leu Ser Arg Asn Gly His Thr Trp Arg
500 505 510

35 Arg Pro

<210> 8
40 <211> 319
<212> PRT
<213> Corynebacterium glutamicum AS019

<400> 8
45 Met Ile Phe Glu Leu Pro Asp Thr Thr Thr Gln Gln Ile Ser Lys Thr
1 5 10 15

Leu Thr Arg Leu Arg Glu Ser Gly Thr Gln Val Thr Thr Gly Arg Val
20 25 30

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

<210> 9

<211> 960

60 <212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum AS019

<220>

	atc	act	tcc	gtg	agg	ctg	acc	ggt	gca	agc	ggc	agt	acc	tcg	gtg	gat	624
	Ile	Thr	Ser	Val	Arg	Leu	Thr	Gly	Ala	Ser	Gly	Ser	Thr	Ser	Val	Asp	
			195					200					205				
5	ttg	gct	gca	ggc	tgg	ttg	gcg	cgg	agg	ctg	aaa	gtg	cct	gtg	atc	cgc	672
	Leu	Ala	Ala	Gly	Trp	Leu	Ala	Arg	Arg	Leu	Lys	Val	Pro	Val	Ile	Arg	
		210					215					220					
10	gag	gtg	aca	gat	gct	ccc	acc	gtg	cca	acc	gat	gag	ttt	ggt	act	cca	720
	Glu	Val	Thr	Asp	Ala	Pro	Thr	Val	Pro	Thr	Asp	Glu	Phe	Gly	Thr	Pro	
		225				230					235					240	
15	ctg	ctg	gct	atc	cag	cgc	ctg	gag	atc	gtt	cgc	acc	acc	ggc	tcg	atc	768
	Leu	Leu	Ala	Ile	Gln	Arg	Leu	Glu	Ile	Val	Arg	Thr	Thr	Gly	Ser	Ile	
					245					250					255		
20	atc	atc	acc	atc	tat	gac	gct	cat	acc	ctt	cag	gta	gag	atg	ccg	gaa	816
	Ile	Ile	Thr	Ile	Tyr	Asp	Ala	His	Thr	Leu	Gln	Val	Glu	Met	Pro	Glu	
				260					265					270			
25	tcc	ggc	aat	gcc	cca	tcg	ctg	gtg	gct	att	ggt	cgt	cga	agt	gag	tcc	864
	Ser	Gly	Asn	Ala	Pro	Ser	Leu	Val	Ala	Ile	Gly	Arg	Arg	Ser	Glu	Ser	
			275					280					285				
30	gac	tgc	ttg	tct	gag	gag	ctt	cgc	cac	atg	gat	cca	gat	ttg	ggc	tac	912
	Asp	Cys	Leu	Ser	Glu	Glu	Leu	Arg	His	Met	Asp	Pro	Asp	Leu	Gly	Tyr	
		290					295					300					
35	cag	cac	gca	cta	tcc	ggc	ttg	tcc	agc	gtc	aag	ctg	gaa	acc	gtc	taa	960
	Gln	His	Ala	Leu	Ser	Gly	Leu	Ser	Ser	Val	Lys	Leu	Glu	Thr	Val		
		305				310					315						
40	<210> 10																
	<211> 319																
	<212> PRT																
	<213> Corynebacterium glutamicum AS019																
45	<400> 10																
	Met	Ile	Phe	Glu	Leu	Pro	Asp	Thr	Thr	Thr	Gln	Gln	Ile	Ser	Lys	Thr	
	1				5					10					15		
50	Leu	Thr	Arg	Leu	Arg	Glu	Ser	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Thr	Gly	Arg	Val	
			20						25					30			
55	Leu	Thr	Leu	Ile	Val	Val	Thr	Asp	Ser	Glu	Ser	Asp	Val	Ala	Ala	Val	
			35					40					45				
60	Thr	Glu	Ser	Thr	Asn	Glu	Ala	Ser	Arg	Glu	His	Pro	Ser	Arg	Val	Ile	
		50				55						60					
65	Ile	Leu	Val	Val	Gly	Asp	Lys	Thr	Ala	Glu	Asn	Lys	Val	Asp	Ala	Glu	
		65				70					75					80	
70	Val	Arg	Ile	Gly	Gly	Asp	Ala	Gly	Ala	Ser	Glu	Met	Ile	Ile	Met	His	
				85						90					95		
75	Leu	Asn	Gly	Pro	Val	Ala	Asp	Lys	Leu	Gln	Tyr	Val	Val	Thr	Pro	Leu	
			100						105					110			
80	Leu	Leu	Pro	Asp	Thr	Pro	Ile	Val	Ala	Trp	Trp	Pro	Gly	Glu	Ser	Pro	
			115					120					125				

Lys Asn Pro Ser Gln Asp Pro Ile Gly Arg Ile Ala Gln Arg Arg Ile
 130 135 140
 5 Thr Asp Ala Leu Tyr Asp Arg Asp Asp Ala Leu Glu Asp Arg Val Glu
 145 150 155 160
 Asn Tyr His Pro Gly Asp Thr Asp Met Thr Trp Ala Arg Leu Thr Gln
 165 170 175
 10 Trp Arg Gly Leu Val Ala Ser Ser Leu Asp His Pro Pro His Ser Glu
 180 185 190
 Ile Thr Ser Val Arg Leu Thr Gly Ala Ser Gly Ser Thr Ser Val Asp
 195 200 205
 15 Leu Ala Ala Gly Trp Leu Ala Arg Arg Leu Lys Val Pro Val Ile Arg
 210 215 220
 20 Glu Val Thr Asp Ala Pro Thr Val Pro Thr Asp Glu Phe Gly Thr Pro
 225 230 235 240
 Leu Leu Ala Ile Gln Arg Leu Glu Ile Val Arg Thr Thr Gly Ser Ile
 245 250 255
 25 Ile Ile Thr Ile Tyr Asp Ala His Thr Leu Gln Val Glu Met Pro Glu
 260 265 270
 Ser Gly Asn Ala Pro Ser Leu Val Ala Ile Gly Arg Arg Ser Glu Ser
 275 280 285
 30 Asp Cys Leu Ser Glu Glu Leu Arg His Met Asp Pro Asp Leu Gly Tyr
 290 295 300
 35 Gln His Ala Leu Ser Gly Leu Ser Ser Val Lys Leu Glu Thr Val
 305 310 315
 40 <210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum ATCC13032
 <400> 11
 45 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Trp Xaa Asn Pro Leu Arg Asp
 1 5 10 15
 50 <210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum ATCC13032
 55 <400> 12
 Met Ile Phe Xaa Leu Pro Asp Xaa Xaa Xaa Gln Gln Ile Ser Lys
 1 5 10 15
 60

Szabadalmi igénypontok

1. Korineform baktériumból származó izolált polinukleotid, mely legalább egy, az alábbiakból álló csoportból kiválasztott polinukleotid-szekvenciát tartalmaz:

- a) polinukleotid, amely legalább 70%-ban azonos egy olyan polipeptidet kódoló polinukleotiddal, amely a 3. vagy 5. vagy 8. vagy 10. azonosítószámú aminosav-szekvenciák közül legalább egyet tartalmaz,
- b) polinukleotid, amely a 3. vagy 5. vagy 8. vagy 10. azonosítószámú aminosav-szekvenciával legalább 70%-ban azonos aminosav-szekvenciát tartalmazó polipeptideket kódol,
- c) olyan polinukleotid, amely komplementer a) vagy b) polinukleotiddal,
- d) olyan polinukleotid, amely az a) vagy b) vagy c) polinukleotid-szekvenciák legalább 15 egymást követő nukleotidját tartalmazza.

2. Az 1. igénypont szerinti polinukleotid, ahol a polinukleotid előnyösen egy olyan rekombináns DNS, amely korineform baktériumokban replikálódni képes, továbbá a tal, tkt, zwf és devB géneket kódoló nukleotidszekvenciák közül legalább egyet tartalmaz.

3. Az 1. igénypont szerinti polinukleotid, ahol a polinukleotid egy RNS.

4. Az 1. igénypont szerinti polinukleotid, amely tartalmazza a 4. vagy 9. azonosítószámú szekvenciát.

5. A 2. igénypont szerinti replikálódni képes DNS, mely tartalmazza az alábbiakat:

- (i) egy vagy több nukleotidszekvenciát a 4. vagy 9. azonosító-

számú szekvenciák közül, vagy

(ii) legalább egy olyan szekvenciát, amelyik megfelel az (i) szekvenciának a genetikai kód degeneráltsági határain belül, vagy

(iii) legalább egy olyan szekvenciát, amelyik hibridizál az (i) vagy (ii) szekvencia komplementer szekvenciájával, és adott esetben

(iv) semleges funkciójú szensz mutációkat az (i)-ben.

6. Az 1. igénypont szerinti polinukleotid, amely legalább egy, a 3. vagy 5. vagy 8. vagy 10. azonosítószámú szekvenciában bemutatott aminosavszekvenciát tartalmazó polipeptidet kódol.

7. Korineform mikroorganizmus, különösen a *Corynebacterium* nemzetség tagja, amelyet az 1. vagy 5. igénypont szerinti replikálódni képes DNS bevitelével transzformáltunk.

8. Eljárás L-aminosavak előállítására, azzal jellemezve, hogy az az alábbi lépéseket hajtjuk végre:

a) fermentáltatjuk a kívánt L-aminosavat termelő baktériumot, amelyben az *opcA* gén mellett előnyösen legalább a *zwf* gén, és adott esetben a *tkt* vagy *devB* gének közül egy vagy több gén amplifikált,

b) a kívánt terméket a tápközegben vagy a baktériumsejtekben koncentráljuk, és

c) a kívánt L-aminosavat izoláljuk.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett géneken kívül a pentóz-foszfát ciklus egy vagy több további génje is amplifikált.

10. A 8. vagy 9. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az amplifikáció eléréséhez a gének vagy

nukleotidszekvenciák kópiaszámát megemeltük úgy, hogy a mikroorganizmusokat ezeket a géneket vagy nukleotidszekvenciákat hordozó plazmidvektorral transzformáltuk.

11. A 8. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az aminosavak, különösen az L-lizin előállítása céljából olyan baktériumokat fermentáltatunk, melyekben az *opcA* génen kívül ugyanabban az időben egy vagy több, az alábbiakból álló csoportból kiválasztott gén amplifikált, különösen overexpresszált:

11.1 a *dapA* gén, amely dihidropikolinát szintáz enzimet kódolja,

11.2 a *lysC* gén, amely az aszpartát kináz feed back rezisztenciáját kódolja,

11.3 a *gap* gén, amely a glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenázt kódolja,

11.4 a *pyc* gén, amely a piruvát karboxilázt kódolja,

11.5 a *tkt* gén, amely a transzketolázt kódolja,

11.6 a *gnd* gén, amely a 6-foszfoglükonát dehidrogenázt kódolja,

11.7 a *lysE* gén, amely a lizin exportot kódolja,

11.8 a *zwa1* gén,

11.9 az *eno* gén, amely az enolázt kódolja,

11.10 a *tal* gén, amely a transzaldolázt kódolja,

11.11 és különösen a *zwf* gén.

12. A 8. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az aminosavak, különösen az L-lizin előállítása céljából olyan baktériumokat fermentáltatunk, melyekben ugyanabban az időben az alábbi csoportból kiválasztott egy vagy több gén legyengített:

12.1 a foszfoenol-piruvát karboxikinázt kódoló *pck* gén,

12.2 a glükóz-6-foszfát izomerázt kódoló *pgi* gén,

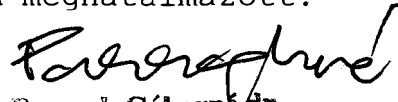
12.3 a piruvát oxidázt kódoló *poxB* vagy

12.4 *zwa* gén.

13. Az 1. igénypont szerinti polinukleotid-szekvenciák alkalmazása primereként olyan gének DNS-ének előállítására polimeráz láncreakcióval, amelyek az *opcA* génnek megfelelő hatást mutatnak.

14. Az 1. igénypont szerinti polinukleotid-szekvenciák alkalmazása hibridizációs próbaként.

A meghatalmazott:


Parragh Gáborné dr.

szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

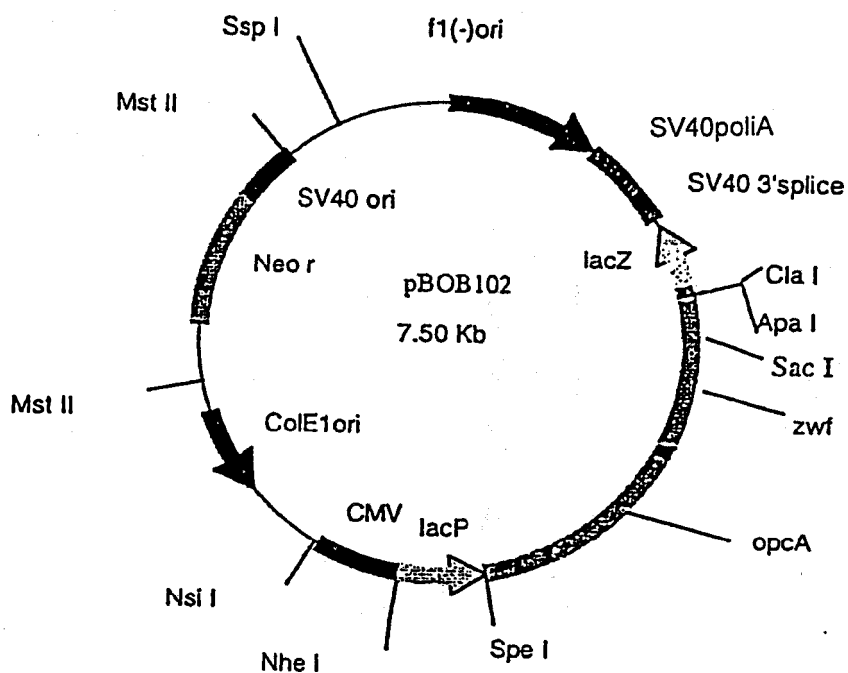
69 oldal

3 oldal

72 oldal

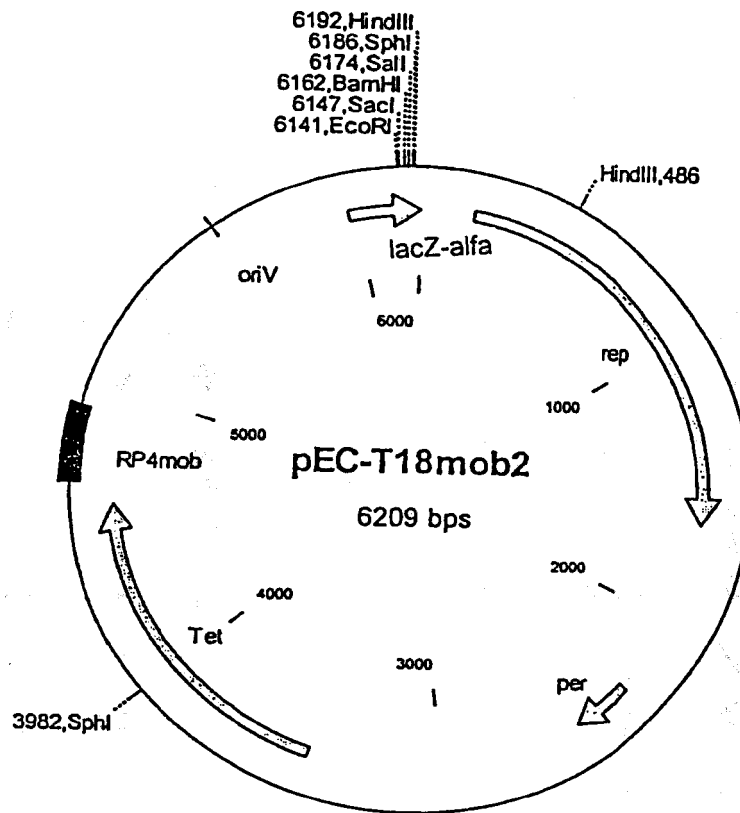
Tervez

3/1

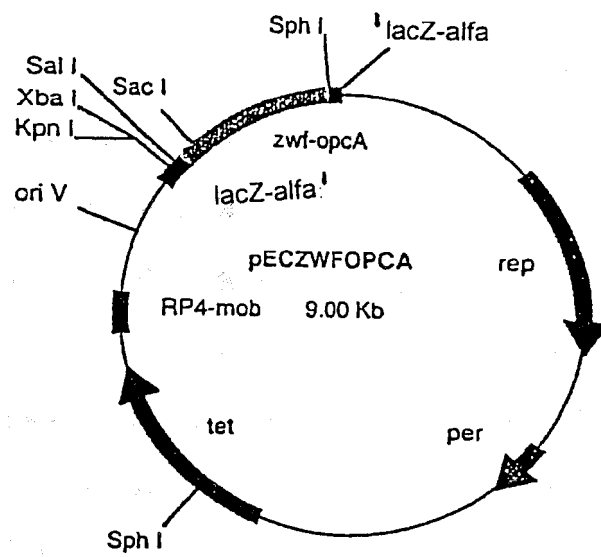


1. ábra

3/2



2. ábra



3. ábra