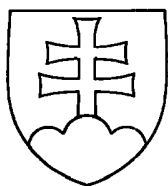


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA**

- (22) Dátum podania prihlášky: **5. 12. 2000**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **199 59 650.6**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **10. 12. 1999**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **DE**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **3. 12. 2001**
Vestník ÚPV SR č.: **12/2001**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT:

(11), (21) Číslo dokumentu:

1857-2000

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :

**C12N 15/55,
C12P 13/04**

(71) Prihlasovateľ: **Degussa-Hüls Aktiengesellschaft, Frankfurt am Main, DE;**

(72) Pôvodca: **Möckel Bettina, Dr., Düsseldorf, DE;
Pfefferle Walter, Dr., Halle (Westf.), DE;
Marx Achim, Dr., Bielefeld, DE;**

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

(54) Názov: **Nukleotidové sekvencie kódujúce gény sdhA, sdhB a sdhC**

(57) Anotácia:
Sú uvedené izolované polynukleotidové sekvencie kódujúce zoslabené gény sdhA, sdhB alebo sdhC a zodpovedajúce aminokyselinové sekvencie kódujúce podjednotky A, B alebo C enzýmu sukcinátdehydrogenázy a spôsob fermentačnej výroby L-aminokyselín bakteriálnym kmeňom transformovaným vektorom nesúcim uvedené gény enzýmu sukcinátdehydrogenázy.

SK 1857-2000 A3

Nukleotidové sekvencie kódujúce gény sdhA, sdhB a sdhC

Oblasť techniky

Predmetom vynálezu sú nukleotidové sekvencie z koryneformných baktérií kódujúce gény sdhC, sdhA a sdhB a spôsob fermentačnej výroby L-aminokyselín, najmä L-lyzínu, zoslabením génu sdhC a/alebo sdhA a/alebo sdhB.

Doterajší stav techniky

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

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

Na zlepšenie úžitkových vlastností týchto mikroorganizmov sa používajú metódy mutagenézy, selekcie a voľby mutantov. Týmto spôsobom sa získajú kmene, ktoré sú rezistentné voči antimetabolitom alebo auxotrofné vzhľadom na regulačne významné metabolity a produkujú L-aminokyseliny.

Už niekoľko rokov sa taktiež používajú metódy technológie rekombinantných DNA na kmeňové zlepšenie kmeňov *Corynebacterium* produkujúcich L-aminokyseliny.

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

L-Aminokyseliny, najmä L-lyzín, sa používajú v humánnej medicíne a vo farmaceutickom priemysle, v potravinárskom priemysle a celkom obzvlášť vo výžive zvierat. Existuje preto všeobecný záujem o poskytnutie nových zlepšených spôsobov výroby L-aminokyselín, najmä L-lyzínu.

Podstata vynálezu

Predmetom vynálezu je izolovaný polynukleotid obsahujúci polynukleotidovú sekvenciu vybranú zo skupiny zahŕňajúcej

a) polynukleotid, ktorý je aspoň na 70 % identický s polynukleotidom, ktorý kóduje polypeptid, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu z SEQ ID No. 3,

b) polynukleotid, ktorý je aspoň na 70 % identický s polynukleotidom, ktorý kóduje polypeptid, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID No. 5,

c) polynukleotid, ktorý je aspoň na 70 % identický s polynukleotidom, ktorý kóduje polypeptid, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID No. 7,

d) polynukleotid, ktorý kóduje polypeptid, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu, ktorá je aspoň na 70 % identická s aminokyselinovou sekvenciou SEQ ID No. 3,

e) polynukleotid, ktorý kóduje polypeptid, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu, ktorá je aspoň na 70 % identická s aminokyselinovou sekvenciou SEQ ID No. 5,

f) polynukleotid, ktorý kóduje polypeptid, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu, ktorá je aspoň na 70 % identická s aminokyselinovou sekvenciou SEQ ID No. 7,

g) polynukleotid, ktorý je komplementárny k polynukleotidom a), b), c), d), e) alebo f), a

h) polynukleotid obsahujúci aspoň 15 za sebou nasledujúcich nukleotidov polynukleotidovej sekvencie a), b), c), d), e) alebo f).

Predmetom vynálezu je aj polynukleotid, ktorým je prednostne rekombinantná DNA, replikovateľná v koryneformných baktériách, ktorá kóduje najmä polypeptid, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu znázornenú v SEQ ID No. 2.

Predmetom vynálezu je aj polynukleotid, ktorým je RNA.

Predmetom vynálezu je aj polynukleotid, pričom sa prednostne jedná o replikovateľnú DNA obsahujúcu:

(i) nukleotidovú sekvenciu znázornenú v SEQ ID No. 1
alebo

- (ii) aspoň jednu sekvenciu, ktorá zodpovedá sekvencii (i) v oblasti degenerácie genetického kódu, alebo
- (iii) aspoň jednu sekvenciu, ktorá hybridizuje so sekvenciou komplementárnou k sekvencii (i) alebo (ii), a poprípade
- (iv) funkčne neutrálne mutácie so zmyslom v (i).

Ďalšími predmetmi sú

vektor obsahujúci jeden z uvedených polynukleotidov,

a koryneformné baktérie slúžiace ako hostiteľské bunky, ktoré obsahujú tento vektor.

Predmetom vynálezu sú aj polynukleotidy, ktoré sa skladajú v podstate z polynukleotidovej sekvencie, ktoré možno získať skríningom prostredníctvom hybridizácie príslušnej génovej banky, ktorá obsahuje úplný gén *sdhC* a/alebo *sdhA* a/alebo *sdhB* s polynukleotidovou sekvenciou zodpovedajúcou SEQ ID No. 1, pomocou sondy, ktorá obsahuje sekvenciu uvedeného polynukleotidu podľa SEQ ID No. 1 alebo jej fragment, a izoláciou uvedenej sekvencie DNA.

Polynukleotidové sekvencie podľa vynálezu sú vhodné ako hybridizačné sondy pre RNA, cDNA a DNA na izoláciu cDNA s celou dĺžkou, ktoré kódujú sukcinátdehydrogenázu alebo jej podjednotky A, B alebo C, a na izoláciu takých cDNA alebo génov, ktoré vykazujú vysokú podobnosť sekvencie so sekvenciou génov pre sukcinátdehydrogenázu alebo jej podjednotky A, B alebo C.

Polynukleotidovém sekvencie podľa vynálezu sú ďalej vhodné ako priméry, pomocou ktorých sa môže pripraviť polymerázovou reťazovou reakciou (PCR) DNA génov, ktoré kódujú sukcinátdehydrogenázu.

Také oligonukleotidy slúžiace ako sondy alebo priméry obsahujú aspoň 30, prednostne aspoň 20, celkom obzvlášť prednostne aspoň 15 za sebou nasledujúcich nukleotidov. Vhodné sú taktiež oligonukleotidy s dĺžkou aspoň 40 alebo 50 nukleotidov.

„Izolovaný“ znamená oddelený zo svojho prirodzeného prostredia.

„Polynukleotid“ sa vzťahuje všeobecne na polyribonukleotidy a polydeoxyribonukleotidy, pričom sa môže jednať o nemodifikované RNA alebo DNA alebo modifikované RNA alebo DNA.

Pod pojmom „polypeptidy“ sa rozumejú peptidy alebo proteíny, ktoré obsahujú dve alebo viac aminokyselín viazaných peptidovými väzbami.

Polypeptidy podľa vynálezu zahŕňajú polypeptidy podľa SEQ ID No. 3 a SEQ ID No. 5 a podľa SEQ ID No. 7, najmä také, ktoré majú biologickú aktivitu sukcinátdehydrogenázy, a aj také, ktoré sú aspoň na 70 % identické s polypeptidom podľa SEQ ID No. 3 a SEQ ID No. 5 a SEQ ID No. 7, prednostne aspoň na 80 % a obzvlášť také, ktoré vykazujú aspoň 90% až 95% identitu s polypeptidom podľa SEQ ID No. 3 a SEQ ID No. 5 a SEQ ID No. 7 a prejavujú uvedenú aktivitu.

Vynález sa ďalej týka spôsobu fermentačnej výroby

L-aminokyselín, najmä L-lyzínu, použitím koryneformných baktérií, ktoré najmä už produkujú L-aminokyseliny, najmä L-lyzín, a v ktorých sa zoslabujú, najmä na nízkej úrovni exprimujú nukleotidové sekvencie kódujúce gén *sdhC* a/alebo gén *sdhA* a/alebo gén *sdhB*.

Pojem „zoslabenie“ opisuje v tejto súvislosti zníženie alebo elimináciu intracelulárnej aktivity jedného alebo viacerých enzýmov (proteínov) v mikroorganizme, ktoré sú kódované príslušnou DNA, tým, že sa napríklad použije sa slabý promótor alebo sa použije gén, popřípade alela, ktorá kóduje príslušný enzým s nízkou aktivitou, popřípade sa príslušný gén alebo enzým (proteín) inaktivuje a tieto opatrenia sa popřípade kombinujú.

Mikroorganizmy, ktoré sú predmetom predloženého vynálezu, môžu produkovať L-aminokyseliny, najmä L-lyzín, z glukózy, sacharózy, laktózy, fruktózy, maltózy, melasy, škrobu, celulózy alebo z glycerolu a etanolu. Môže sa jednať o zástupcov koryneformných baktérií, najmä rodu *Corynebacterium*. Pri rode *Corynebacterium* treba uviesť najmä druh *Corynebacterium glutamicum*, ktorý je v odbornom svete známy pre svoju schopnosť produkovať L-aminokyseliny.

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

Corynebacterium glutamicum ATCC13032,
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806,
Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870,
Corynebacterium melassecola ATCC17965,
Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539,
Brevibacterium flavum ATCC14067,

Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 a
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

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

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 a
Corynebacterium glutamicum DSM5714.

Vynálezcom sa podarilo izolovať z *C. glutamicum* nové
gény *sdhC*, *sdhA* a *sdhB* kódujúce enzým sukcinátdehydrogenázu
(E.C. 1.3.99.1).

Na izoláciu génu *sdhC* a/alebo *sdhA* a/alebo *sdhB* alebo
aj iných génov z *C. glutamicum* sa najskôr založí génová
banka tohto mikroorganizmu v *E. coli*. Založenie génových
bánk je opísané vo všeobecne známych učebniciach a
príručkách. Ako príklad možno uviesť učebnicu Winnacker:
Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie
(Verlag Chemie, Weinheim, Nemecko, 1990) alebo príručku
Sambrook et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*
(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Veľmi známou
génovou bankou je génová banka kmeňa W3110 *E. coli* K-12,
ktorú založili Kohara et al. (Cell 50, 495 - 508 (1987)) v
λ-vektoroch. Bathe et al. (Molecular and General Genetics,
252:255-265, 1996) opisujú génovú banku *C. glutamicum*
ATCC13032, ktorá bola založená pomocou kozmidového vektora
SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National
Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) v kmeni NM554 *E. coli*

K-12 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575). Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326 (1992)) zasa opisujú génovú banku *C. glutamicum* ATCC13032 s použitím kozmidu pH79 (Hohn a Collins, Gene 11, 291-298 (1980)). O'Donohue (The Cloning and Molecular Analysis of Four Common Aromatic Amino Acid Biosynthetic Genes from *Corynebacterium glutamicum*. Ph. D. Thesis, National University of Ireland, Galway, 1997) opisuje klonovanie génov *C. glutamicum* použitím systému exprese λ Zap opísaného v Short et al. (Nucleic Acids Research, 16: 7583).

Na vytvorenie génovej banky *C. glutamicum* v *E. coli* sa môžu použiť aj plazmidy, ako napríklad pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979) alebo pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268). Ako hostitelia sú vhodné najmä také kmene *E. coli*, ktoré sú reštrikčne a rekombinačne defektné, napríklad kmeň DH5 α (Jeffrey H. Miller: „A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria“, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1992).

Dlhé fragmenty DNA klonované pomocou kozmidov alebo λ -vektorov sa potom zasa môžu subklonovať do bežných vektorov vhodných na sekvenovanie DNA.

Metódy sekvenovania DNA sa opisujú medzi iným v Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 74:5463-5467, (1977)).

Získané sekvencie DNA sa potom môžu skúmať známymi algoritmami, poprípade programami na sekvenčnú analýzu, napríklad pomocou Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), pomocou programu GCG od Butlera (Methods of

Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)), pomocou algoritmu FASTA od Pearsona a Lipmana (Proceedings of the National Academy of Sciences USA 85,2444-2448 (1988)) alebo pomocou algoritmu BLAST od Altschul et al. (Nature Genetics 6, 119-129 (1994)) a porovnať so zápsmi sekvencií vo verejne prístupných databankách. Verejne prístupnými databankami pre nukleotidové sekvencie sú napríklad European Molecular Biologies Laboratories (EMBL, Heidelberg, Nemecko) alebo databanka National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA).

Týmto spôsobom sa získala nová sekvencia DNA z *C. glutamicum* kódujúca gén *sdhC*, gén *sdhA* a gén *sdhB*, ktorá je ako SEQ ID No. 1 súčasťou predloženého vynálezu. Ďalej sa z tejto sekvencie DNA odvodila aminokyselinová sekvencia príslušných proteínov pomocou vyššie opísaných metód. V SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 a SEQ ID No. 7 sú znázornené vyplývajúce aminokyselinové sekvencie génového produktu *sdhC*, *sdhA* a *sdhB*.

Kódujúce sekvencie DNA, ktoré vyplývajú z SEQ ID No. 1 v dôsledku degenerovateľnosti genetického kódu, sú taktiež súčasťou vynálezu. V odbornom svete sú ďalej konzervatívne zámény aminokyselín, ako napríklad zámena glycínu za alanín alebo kyseliny asparágovej za kyselinu glutámovú, v proteínoch, známe ako „mutácie so zmyslom“ (sense mutations), ktoré nevedú k žiadnej zásadnej zmene aktivity proteínu, t. zn. sú funkčne neutrálne. Ďalej je známe, že zmeny na N-konci a/alebo C-konci proteínu nemôžu jeho funkciu podstatne obmedzovať alebo ju dokonca môžu stabilizovať. Údaje k tomu nájde odborník medzi iným v Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), Sahin-Toth et al. (Protein Sciences

3:240-247 (1994)), v Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) a v známych učebniciach genetiky a molekulovej biológie. Aminokyselinové sekvencie, ktoré vyplývajú príslušným spôsobom z SEQ ID NO. 1, a sekvencie DNA kódujúce tieto aminokyselinové sekvencie sú taktiež súčasťou tohto vynálezu.

Súčasťou vynálezu sú rovnako aj sekvencie DNA, ktoré hybridizujú s SEQ ID No. 1 alebo časťami SEQ ID No. 1. Napokon sú súčasťou vynálezu sekvencie DNA, ktoré sa pripravujú polymerázovou reťazovou reakciou (PCR) použitím primérov, ktoré vyplývajú z SEQ ID No. 1.

Návody na identifikáciu sekvencií DNA pomocou hybridizácie nájde odborník medzi iným v príručke „The DIG System Users Guide for Filter Hybridization“ od firmy Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Nemecko, 1993) a v Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Návody na amplifikáciu sekvencií DNA pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) nájde odborník medzi iným v príručke Gait: Oligonukleotide synthesis: a practical approach (IRL Press, Oxford, Veľká Británia, 1984) a v Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Nemecko, 1994).

Vynálezcovia zistili, že koryneformné baktérie po zoslabení génu *sdhC* a/alebo *sdhA* a/alebo *sdhB* produkujú zlepšeným spôsobom L-aminokyseliny, najmä L-lyzín.

Na dosiahnutie zoslabenia sa môže znížiť alebo vylúčiť buď expresia génu *sdhC* a/alebo *sdhA* a/alebo *sdhB*, alebo katalytické vlastnosti enzýmových proteínov. Poprípade sa môžu obidve tieto opatrenia kombinovať.

Zníženie expresie génov môže nastať vhodným uskutočnením kultivácie alebo genetickou zmenou (mutáciou) signálnej štruktúry expresie génov. Signálnymi štruktúrami expresie génov sú napríklad represorové gény, aktivátorové gény, operátory, promótory, atenuátory, väzbové miesta ribozómov, iniciačný kodón a terminátory. Údaje k tomu nájde odborník napríklad v patentovej prihláške WO 96/15246, v Boyd a Murphy (Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), Voskuil a Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), v Jensen a Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191 (1998)), Patek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)) a v známych učebniciach genetiky a molekulovej biológie, ako napríklad v učebnici Knippers („Molekulare Genetik“, 6. vydanie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Nemecko, 1995) alebo Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Nemecko, 1990).

Mutácie, ktoré vedú k zmene, poprípade zoslabeniu katalytických vlastností enzýmových proteínov, sú známe zo stavu techniky; ako príklady sa môžu uviesť práce Qiu a Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762 (1997)) a Möckel („Die Threonin-dehydratase aus Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms“, správy Výskumného centra Jülichs, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Nemecko, 1994). Súborné opísania sa môžu prevziať zo známych učebníc genetiky a molekulovej biológie, ako napríklad Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986).

Ako mutácie prichádzajú do úvahy tranzície, transverzie, inzercie a delécie. V závislosti od účinku zámeny

aminokyselín na enzýmovú aktivitu sa hovorí o mutáciách s pozmeneným zmyslom („missense mutations“) alebo mutáciách bez zmyslu („nonsense mutations“). Inzercie alebo delécie aspoň jedného páru báz v géne vedú k posunovým mutáciám („frame shift mutations“), následkom ktorých sa vkladajú nesprávne aminokyseliny alebo sa predčasne prerušuje translácia. Delécie viacerých kodónov vedú typicky k úplnému zlyhaniu enzýmovej aktivity. Návod na vytvorenie takých mutácií patria do stavu techniky a môžu sa nájsť v známych učebniciach genetiky a molekulovej biológie, ako napríklad v učebnici Knippers („Molekulare Genetik“, 6. vydanie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Nemecko, 1995), Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Nemecko, 1990) alebo Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986).

Obvyklou metódou mutácie génov *C. glutamicum* je metóda prerušenia génu („gene disruption“) a zámény génov („gene replacement“), ktorú opísal Schwarzer a Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)).

Pri metóde prerušenia génov sa centrálna časť kódujúcej oblasti záujmového génu klonuje do plazmidového vektora, ktorý sa môže replikovať v hostiteľovi (typicky *E. coli*), avšak nie v *C. glutamicum*. Ako vektory prichádzajú do úvahy napríklad pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob alebo pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pK18mobsacB alebo pK19mobsacB (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174:5462-65 (1992)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US patent 5,487,993), pCR®Blunt (firma Invitrogen, Groningen, Holandsko; Bernard et al., Journal of Molecular Biology,

234: 534-541 (1993)) alebo pEM1 (Schrumpf et al., 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516). Plazmidový vektor, ktorý obsahuje centrálnu časť kódujúcej oblasti génu sa potom preniesie konjugáciou alebo transformáciou do žiadaného kmeňa *C. glutamicum*. Metóda konjugácie je opísaná napríklad v Schäfer et al., (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)). Metódy transformácie sa opisujú napríklad v Thierbach et al., (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican a Shivan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) a Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)). Po homológnej rekombinácii pomocou „cross over“ udalosti sa kódujúca oblasť uvedeného génu preruší pomocou vektorovej sekvencie a získajú sa dve neúplné alely, ktorým chýbajú 3'-konce, poprípade 5'-konce. Túto metódu použil napríklad Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994)) na elimináciu génu *recA* z *C. glutamicum*. Gén *sdhC* a/alebo *sdhA* a/alebo *sdhB* sa môže týmto spôsobom eliminovať.

Pri metóde zámeny génov („gene replacement“) sa mutácia, napríklad delécia, inzercia alebo zámena báz, vytvára v záujmovom géne in vitro. Pripravená alela sa zasa klonuje do vektora nereplikatívneho pre *C. glutamicum* a tento sa potom preniesie transformáciou alebo konjugáciou do žiadaného hostiteľa *C. glutamicum*. Po homológnej rekombinácii prostredníctvom prvej udalosti „cross-over“ spôsobujúcej integráciu a vhodnej druhej udalosti „cross-over“ spôsobujúcej excíziu v cieľovom géne, poprípade v cieľovej sekvencii, sa dosiahne zavedenie mutácie, poprípade alely. Túto metódu použil napríklad Peters-Wendisch (Microbiology 144, 915 -927 (1998)), aby deléciou eliminoval gén *pyc* z *C. glutamicum*. Do génu *sdhC* a/alebo *sdhA* a/alebo

sdhB sa týmto spôsobom môže zaviesť delécia, inzercia alebo záměna báz.

Ďalším predmetom vynálezu je preto spôsob fermentačnej výroby L-aminokyselín, najmä L-lyzínu, pri ktorom sa buď používa kmeň transformovaný plazmidovým vektorom, a tento plazmidový vektor nesie nukleotidové sekvencie génov kódujúcich enzým sukcinátdehydrogenázu, alebo tento kmeň nesie delécii, inzerciu alebo záměnu báz v géne sdhC a/alebo sdhA a/alebo sdhB.

Spôsob fermentačnej výroby L-aminokyselín, najmä L-lyzínu, obsahujúci nasledovné kroky:

- a) fermentáciu koryneformných baktérií produkujúcich L-aminokyselinu, v ktorých sa zoslabuje aspoň jeden z génov zvolených zo skupiny génov kódujúcich enzým sukcinátdehydrogenázu a jeho podjednotky A, B a C,
- b) koncentrovanie L-aminokyseliny v médiu alebo v bunkách baktérií a
- c) izoláciu L-aminokyseliny.

Prídavne môže byť pre produkciu L-aminokyselín, najmä L-lyzínu, výhodné prídavne k zoslabeniu génu sdhC a/alebo sdhA a/alebo sdhB zosilniť, najmä nadmerne exprimovať jeden alebo viac enzýmův danej biosyntetickej dráhy, glykolýzy, anaplerotiky, cyklu kyseliny citrónovej alebo exportu aminokyselín.

Takto sa napríklad môže na prípravu L-lyzínu nadmerne exprimovať

- súčasne gén *dapA* kódujúci dihydrodipikolinátsyntázu (EP-B 0 197 335) alebo
- súčasne gén *gap* kódujúci glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázu (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174: 6076-6086) alebo
- súčasne gén *pyc* kódujúci pyruvátkarboxylázu (DE-A-198 31 609) alebo
- súčasne gén *mgo* kódujúci malát-chinónoxidoreduktázu (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998)) alebo
- súčasne gén *lysE* kódujúci export L-lyzínu (DE-A-195 48 222).

Ďalej môže byť pre produkciu L-aminokyselín, najmä L-lyzínu, výhodné okrem nárokováných génov súčasne zoslabiť

- gén *pck* kódujúci fosfoenolpyruvátkarboxykinázu (DE 199 50 409.1, DSM 13047) a/alebo
- gén *pgi* kódujúci glukóza-6-fosfátizomerázu (US 09/396,478, DSM 12969).

Ďalej môže byť pre produkciu aminokyselín, najmä L-lyzínu, okrem zoslabenia génu *sdhC* a/alebo *sdhA* a/alebo *sdhB* výhodné vylúčiť nežiaduce vedľajšie reakcie (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms“, in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, Londýn, Veľká Británia, 1982).

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

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

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

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

Metódy stanovenia L-aminokyselín sú známe zo stavu techniky. Analýza sa môže uskutočňovať tak, ako sa opisuje v Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958) 1190) anexovou chromatografiou s následnou ninhydrínovou derivatizáciou alebo sa môže uskutočňovať pomocou HPLC v obrátenej fáze („reversed phase“ HPLC), ako sa opisuje

v Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174).

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

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Vytvorenie genómovej kozmidovej génovej banky z *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

Chromozómová DNA z *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 sa izolovala tak, ako sa opisuje v Tauch et al., (1995, Plasmid 33: 168-179), a čiastočne rozštiepila reštrikčným enzýmom Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Nemecko, opis produktu Sau3AI, Code no. 27-0913-02). Fragmenty DNA sa defosforylovali pomocou alkalického fosfatázy z garnátov (shrimp) (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Nemecko, opis produktu SAP, Code no. 1758250). DNA kozmidového vektora SuperCos1 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84:2160-2164), získaná od firmy Stratagene (La Jolla, USA, opis produktu SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301), sa štiepila reštrikčným enzýmom XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Nemecko, opis produktu XbaI, Code no. 27-0948-02) a taktiež defosforylovala alkalickou fosfatázou z garnátov. Následne sa kozmidová DNA štiepila reštrikčným enzýmom BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Nemecko, opis produktu BamHI, Code no. 27-0868-04). Týmto spôsobom spracovaná kozmidová DNA sa zmiešala so spracovanou DNA ATCC13032 a zmes sa spracovala T4-DNA-ligázou (Amersham Pharmacia, Freiburg, Nemecko, opis produktu T4-DNA-ligáza, Code no. 27-0870-04). Ligačná zmes sa potom

pomocou Gigapack II XL Packing Extract (Stratagene, La Jolla, USA, opis produktu Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) vbalila do fágov. Na infekciu kmeňa *E. coli* NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) sa bunky extrahovali v 10mM MgSO₄ a zmiešali s alikvotóm suspenzie fágov. Infekcia a titrácia kozmidovej banky sa uskutočnila tak, ako sa opisuje v Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor), pričom sa bunky naniesli na agar LB (Lennox, 1955, Virology, 1:190) so 100 µg/ml ampicilínu. Po inkubácii cez noc pri 37 °C sa selektovali jednotlivé rekombinantné klony.

Príklad 2

Izolácia a sekvenovanie génov *sdhC*, *sdhA* a *sdhB*

Kozmidová DNA jednej jednotlivkej kolónie sa izolovala pomocou Qiaprep Spin Miniprep Kit (produkt č. 27106, Qiagen, Hilden, Nemecko) podľa údajov výrobcu a čiastočne rozštiepila reštrikčným enzýmom Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Nemecko, opis produktu Sau3AI, produkt č. 27-0913-02). Fragmenty DNA sa defosforylovali pomocou alkalické fosfatázy z garnátov (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Nemecko, opis produktu SAP, produkt č. 1758250). Po separácii gélovou elektroforézou sa uskutočnila izolácia kozmidových fragmentov s rozsahom veľkostí 1 500 až 2 000 bp pomocou QiaExII Gel Extraction Kit (produkt č. 20021, Qiagen, Hilden, Nemecko). DNA sekvenačného vektora pZero-1, získaná od firmy Invitrogen (Groningen, Holandsko, opis produktu Zero Background Cloning Kit, produkt č. K2500-01), sa štiepila reštrikčným enzýmom BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Nemecko, opis produktu BamHI, produkt č. 27-0868-04). Ligácia kozmidových fragmentov do sekvenačného vektora

pZero-1 sa uskutočnila tak, ako sa opisuje v Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor), pričom zmes DNA s T4-ligázou (Pharmacia Biotech, Freiburg, Nemecko) sa inkubovala cez noc. Táto ligačná zmes sa následne elektroporovala (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) do kmeňa *E. coli* DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87: 4645-4649) a naniesla na agar LB (Lennox, 1955, Virology, 1:190) s 50 μ g/ml zeocínu. Plazmidová preparácia rekombinantných klonov sa uskutočňovala pomocou Biorobot 9600 (product č. 900200, Qiagen, Hilden, Nemecko). Sekvenovanie sa uskutočňovalo dideoxymetódou ukončenia reťazca podľa Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academies of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) s modifikáciami podľa Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Použil sa „RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit“ od PE Applied Biosystems (produkt č. 403044, Weiterstadt, Nemecko). Separácia gélovou elektroforézou a analýza sekvenačnej reakcie sa uskutočňovala v géle „Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid“ (29:1) (produkt č. Al24.1, Roth, Karlsruhe, Nemecko) pomocou prístroja na sekvenovanie „ABI Prism 377“ od PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Nemecko).

Získané nespracované údaje o sekvenciách sa následne spracovali procesorom použitím programového balíka Staden (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0. Jednotlivé sekvencie derivátov pZero1 sa zostavili do jedného súvislého celku. Počítačová analýza kódujúcich oblastí sa uskutočnila pomocou programu XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231). Ďalšie analýzy sa uskutočnili pomocou „BLAST search programs“ (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Research, 25:3389-3402) proti

neredundantnej databanke od „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI, Bethesda, MD, USA).

Získaná nukleotidová sekvencia je znázornená v SEQ ID No. 1. Analýza nukleotidovej sekvencie poskytla otvorený čítací raster s 879 párami báz, ktorý sa označil ako gén *sdhC*, otvorený čítací raster s 1875 párami báz, ktorý sa označil ako *sdhA*, a otvorený čítací raster s 852 párami báz, ktorý sa označil ako *sdhB*. Gén *sdhC* kóduje polypeptid s 293 aminokyselinami, ktorý je znázornený v SEQ ID No. 3. Gén *sdhA* kóduje polypeptid so 625 aminokyselinami, ktorý je znázornený v SEQ ID No. 5. Gén *sdhB* kóduje polypeptid s 284 aminokyselinami, ktorý je znázornený v SEQ ID No. 7.

Príklad 3

Príprava integračného vektora na integračnú mutagenézu génu *sdhA*

Z kmeňa ATCC 13032 sa metódou podľa Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817-1828 (1994)) izolovala chromozomová DNA. Na základe sekvencie génu *sdhA* známej z príkladu 2 pre *C. glutamicum* sa selektovali nasledovné oligonukleotidy pre polymerázovú reťazovú reakciu:

sdhA-in1:

5'CGT CAT TGT CAC CGA ACG TA 3'

sdhA-in2:

5'TCG TTG AAG TCA GTC CAG AG 3'

Znázornené priméry syntetizovala firma MWG Biotech (Ebersberg, Nemecko) a PCR reakcia sa uskutočnila podľa štandardnej metódy PCR od Innisa et al. (PCR protocols. A

guide to methods and applications, 1990, Academic Press) s polymerázou Pwo od firmy Boehringer Mannheim (Nemecko, opis produktu Pwo DNA-polymeráza, produkt č. 1 644 947). Pomocou tejto polymerázovej reťazovej reakcie umožnili priméry amplifikáciu interného fragmentu génu *sdhA* s veľkosťou približne 0,67 kb. Takto amplifikovaný produkt sa skúmal elektroforézou v 0,8% agarózovom géle.

Amplifikovaný fragment DNA sa ligoval pomocou Zero Blunt™ Kit od firmy Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA; katalógové číslo K2700-20) do vektora pCR®Blunt II (Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)).

Kmeň *E. coli* TOP10 sa potom elektroporoval s ligačnou zmesou (Hanahan, In: DNA cloning. A practical approach. zv. I., IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA, 1985). Selekcia buniek nesúcich plazmid sa uskutočnila nanesením transformačnej zmesi na agar LB (Sambrook et al., Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), ktorý bol doplnený 25 mg/l kanamycínu. Plazmidová DNA sa izolovala z jedného transformantu použitím QIAprep Spin Miniprep Kit od firmy Qiagen a analyzovala reštrikciou reštrikčným enzýmom EcoRI a následnou elektroforézou v agarózovom géle (0,8%). Plazmid sa nazval pCRBluntsdhAint a je znázornený na obrázku 1.

Príklad 4

Integračná mutagenéza génu *sdhA* v kmeni DSM 5715

Vektor pCRBluntsdhAint uvedený v príklade 3 sa elektroporoval do *C. glutamicum* DSM 5715 podľa elektropo-

račnej metódy od Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters, 123:343-347 (1994)). Kmeň DSM 5715 je opísaný v EP-B-0435132. Vektor pCRBluntsdhAint sa nemôže samostatne replikovať v DSM5715 a zachováva sa v bunke len vtedy, ak sa integroval do chromozómu DSM 5715. Selekcia klonov pomocou pCRBluntsdhAint integrovaného do chromozómu sa uskutočnila nanesením elektroporačnej zmesi na agar LB (Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), ktorý bol doplnený 15 mg/l kanamycínu.

Na dôkaz integrácie sa fragment *sdhAint* označil metódou „The DIG System Users Guide for Filter Hybridization“ od firmy Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Nemecko, 1993) pomocou hybridizačného kitu Dig od firmy Boehringer. Chromozómová DNA potenciálneho integrantu sa izolovala metódou od Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) a štiepila reštrikčným enzýmom SphI a HindIII. Vznikajúce fragmenty sa separovali pomocou elektroforézy v agarózovom géle a hybridizovali pomocou hybridizačného kitu Dig od firmy Boehringer pri 68 °C. Plazmid pCRBluntsdhAint uvedený v príklade 3 sa vnútri chromozómového génu *sdhA* vložil do chromozómu DSM5715. Kmeň sa označil DSM5715::pCRBluntsdhAint.

Príklad 5

Príprava kyseliny L-glutámovej pomocou kmeňa
DSM5715::pCRBluntsdhAint

Kmeň *C. glutamicum* DSM5715::pCRBluntsdhAint získaný v príklade 4 sa kultivoval v živnom médiu vhodnom na produk-

ciu kyseliny glutámovej a obsah kyseliny glutámovej sa stanovoval v kultivačnom supernatante.

Na tento účel sa kmeň najskôr inkuboval 24 hodín pri 33 °C na agarovej platni s príslušným antibiotikom (mozgovo-srdcový agar s kanamycínom (25 mg/l)). Vychádzajúc z kultúry z tejto agarovej platne sa naočkovala predkultúra (10 ml média v 100 ml Erlenmeyerovej banke). Médium použitým pre predkultúru bolo úplné médium CgIII.

Médium Cg III

NaCl	2,5 g/l
Bacto-peptón	10 g/l
Bacto-yeast extract	10 g/l
Glukóza (oddelené autoklávovaná)	2 % (hmotnosť/objem)

Hodnota pH sa nastavila na 7,4.

K tomu sa pridal kanamycín (25 mg/l). Predkultúra sa inkubovala 16 hodín pri 33 °C pri 240 ot./min v pretrepávačke. Hlavná kultúra sa naočkovala touto predkultúrou tak, aby začiatočná optická hustota (660 nm) hlavnej kultúry bola 0,1. Pre hlavnú kultúru sa použilo médium MM.

Médium MM:

CSL (Corn Steep Liquor)	5 g/l
MOPS (kyselina morfolinopropán-sulfónová)	20 g/l
Octan sodný (sterilne filtrovaný)	20 g/l
Soli:	
(NH ₄) ₂ SO ₄	25 g/l
KH ₂ PO ₄	0,1 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0 g/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	10 mg/l
FeSO ₄ .7H ₂ O	10 mg/l
MnSO ₄ .H ₂ O	5,0 mg/l
Biotín (sterilne filtrovaný)	0,3 mg/l
Tiamín.HCl (sterilne filtrovaný)	0,2 mg/l
Leucín (sterilne filtrovaný)	0,1 g/l
CaCO ₃	25 g/l

CSL, MOPS a roztok solí sa roztokom amoniaku nastavili na pH 7 a autoklávovali. Potom sa pridali sterilné roztoky substrátu a vitamínov, ako aj za sucha autoklávaný CaCO₃.

Kultivácia sa uskutočňovala v 10 ml objemoch v 100 ml Erlenmeyerovej banke s priehradkami. Pridal sa kanamycín (25 mg/l). Kultivácia sa uskutočňovala pri 33 °C a 80% vlhkosti vzduchu.

Po 24 hodinách sa určila optická hustota (OD) pri meracej vlnovej dĺžke 660 nm pomocou Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, Mníchov). Vytvorené množstvo kyseliny glutámovej sa stanovilo pomocou analyzátora aminokyselín od firmy Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Nemecko) ionexovou

chromatografiou a derivatizáciou na prídavnom stĺpci
s ninhydrínovou detekciou.

Výsledok pokusu je uvedený v tabuľke 1.

Tabuľka 1

Kmeň	Optická hustota (660)	Kyselina L-glu- támová (mg/l)
DSM5715	6,6	41
DSM5715::pCRBluntsdhAint	5,1	155

Prehľad obrázkov na výkresoch

Priložené sú nasledovné obrázky:

Obrázok 1: Mapa plazmidu pCRBluntsdhAint

Použité skratky a značky majú nasledovný význam. Pri údajoch o počte párov báz sa jedná o približné hodnoty, ktoré sa získajú v rámci reprodukovateľnosti meraní.

Km: gén pre rezistenciu na kanamycín

Zeocin: gén pre rezistenciu na zeocín

HindIII: štiepne miesto pre reštrikčný enzým HindIII

SphI: štiepne miesto pre reštrikčný enzým SphI

EcoRI: štiepne miesto pre reštrikčný enzým EcoRI

sdhAint: interný fragment génu sdhA

ColE1 ori: počiatok replikácie plazmidu ColE1

PROTOKOL SEKVENCÍ

<110> Degussa-Hüls AG

<120> Nové nukleotidové sekvencie kódujúce:
gény sdhA, sdhB a sdhC

<130> 990170 BT

<140>

<141>

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 4080

<212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>

<221> gén

<222> (288)..(1169)

<223> sdhC

<220>

<221> gén

<222> (1330)..(3207)

<223> sdhA

<220>

<221> gén

<222> (3102)..(3956)

<223> sdhB

<400> 1

```

gtgcccggcg tggtcgggcc acatccgccc cgggaaacttt ttaggcacct acggtgcaac 60
tggtgggata attgtgtcac ctgcgcaaag ttgtccctg gatcggaagg ttgggctgtc 120
taaacttttt gggtgatacc aaacgggggt agaaactgtt cggatcggtt tcctgtgagg 180
aagctcacct tggttttaga atgttgaaaa ggcctcacgt ttccgcaggt agagcacact 240
caattaaatg agcgtcaaac gacaataaag taaggctatc ctaataagtg gggttttatg 300
tctctaaaca gccagttggg ggtcatgggg gagcgccccg tgactgggta atgccccgat 360
ctgggacgta cagtaacaac gacactggag gtgccatgac tgtagaaat cccgaccgtg 420
aggcaatccg tcacggaaaa attacgacgg aggcgctgcg tgagcgtccc gcataccga 480
cctgggcaat gaagctgacc atggccatca ctggccta at gtttgggtggc ttcgttcttg 540
ttcacatgat cggaaacctg aaaatcttca tgccggacta cgcagccgat tctgcgcatac 600
cgggtgaagc acaagtagat gtctacggcg agttcctgcg tgagatcgga tccccgatcc 660
tcccacacgg ctacgtcttc tggatcctac gtattatcct gctggtcgca ttggttctgc 720
acatctactg tgcattcgca ttgaccggcc gttctcacca gtcccgcgga aagttccgcc 780
gtaccaacct cggtggcggc ttcaactcct tcgcgacccg ctccatgctg gtgaccggaa 840
tcgttctcct tgcgttcatt atcttcaca tctcgcacct gaccatgggt gttgctccag 900
cagccccaac ctcatctcgag cacggcgaag tatacgcaaa catgggtggc tccttttagcc 960
gctggcctgt agcaatttgg tacatcattg ccaacctggt cctgttcgtc cacctgtcac 1020
acggcatctg gcttgcatgc tctgacctgg gaatcacggc acgcgctgg agggcaatcc 1080
tcctcgcatg tgcgtacatc gttcctgcac tggctctgat cggcaacatc accattccgt 1140
tcgccatcgc tgttggtcgg attgcgtaaa ggtaggaag aatttatgag cactcactct 1200
gaaaccaccc gccagaggtt catccacca gtctcagtec tcccagaggt ctgagctggg 1260
acggctcctg acgctgcaga gccagcaggc gttcccacca aagatatgtg ggaataccaa 1320

```

```

aaagaccaca tgaacctggt ctccccactg aaccgacgca agttccgtgt cctcgtcggt 1380
ggcaccggcc tgtccggtgg tgctgcagca gcagccctcg gcgaactcgg atacgacgtc 1440
aaggcgttca cctaccacga cgcacctcgc cgtgcgcaact ccattgctgc acaggggtggc 1500
gttaactccg cccgcgga caaggtagac aacgacggcg cataccgcca cgtcaaggac 1560
accgtcaagg gcggcgacta ccgtggtcgc gactccgact gctggcgctc cgccgtcgag 1620
tccgtccgcg tcatcgacca catgaacgcc atcggtgac cattcgccc cgaatacggg 1680
ggcgcccttg caacctgttc cttcgggtgg gtgcaggctc cccgtacctt ctacaccggt 1740
ggacaaaccg gacagcagct gcagctctcc accgcatccg cactacagcg ccagatccac 1800
ctcggctccg tagaaatctt caccataaac gaaatggttg acgtcattgt caccgaacgt 1860
aacggtgaaa agcgtgcga aggcctgatc atgcgcaacc tgatcaccgg cgagctcacc 1920
gcacacaccg gccatgccgt tatectggca accggtggct acggcaacgt gtaccacatg 1980
tccaccctgg ccaagaactc caacgcctcg gccatcatgc gtgcatacga agccggcgca 2040
tacttcgctg ccccatcggt catccagttc caccacaacc gcctgcctgt gaactccacc 2100
tggcagtgca agaccattct gatgtccgag tcgctgcgta acgacggccg catctgggtc 2160
cctaaggaa cgaacgataa ccgcgatcca aacaccatcc ctgaggatga gcgcgactac 2220
ttcctggagc gccgtaccc agcattcggt aacctcgctc cactgacgt tgettccggt 2280
cgcatctccc agcagatcaa tgctggtctc ggtgttgga ctctgaaca cgctgcatac 2340
ctggacttcc gcgacgccac cgagcgcttc ggacaggaca ccatccgcga gcgttactcc 2400
aacctcttca ccatgtacga agaggcaatt ggcgaggacc catactccag cccaatgcgt 2460
attgcaccga cctgccactt caccatgggt ggcctctgga ctgacttcaa cgaaatgacg 2520
tactcccag gtctgttctg cgcaggcgaa gcatcctgga cctaccacgg tgcaaacggt 2580
ctgggcgcaa actccctgct ctccgcttcc gtcatgggt ggttcacct gccattcacc 2640
atccctaact acctcggccc attgcttggc tccgagcgtc tgctcagagg tgaccagaa 2700
gcacaggcag cgattgcgag tgcacaggct cgcattgacc gcctcatggg caaccgcca 2760
gagtggtgag gtgacaacgt tcacggacct gactactacc accgccagct tggcgatatc 2820
ctgtacttct cctgtggcgt ttcccgaaac gtagaagacc tccaggatgg catcaacaag 2880
atccgtgccc tccgcgatga cttctggaag aacatgcgca tcaccggcag caccgatgag 2940
atgaaccagg ttctcgaata cgcagcacgc gtagccgact acatcgacct cggcgaaactc 3000
atgtgtgtcg acgccctcga ccgcgacgag tcctgtggcg ctcaactccg cgacgaccac 3060
ctctccgaag atggcgaagc agaacgtgac gacgaaaact ggtgcttcgt ctccgcatgg 3120
gaaccaggcg agaacggaac cttcgtccgc cagcgagaac cactgttctt cgaatccgtc 3180
ccactgcaga caaggaaact caagtaatga aacttacact tgagatctgg cgtcaagcag 3240
gcccacttgc ggaaggcaag ttcgaaaccg tccaggttga cgacgccgtc gcgcagatgt 3300
ccatcctgga gctgcttgac cacgtaaac acaagttcat cgaagaaggc aaagaaccat 3360
tcgcttccgc ctctgactgc cgcgaaggca tttgtggtac ctgtggtctc ctcgtgaacg 3420
gtcgccctca cggcgccgac cagaacaagc ctgcctgtgc gcagcgccgt gtcagctaca 3480
aggaaggcga caccctcaag atcgaaccac tgcgttccgc cgcatacca gtgatcaagg 3540
acatggtcgt cgaccgtcc gcactggacc gtgtcatgga acaggggtggc tacgtgacca 3600
tcaacgcagg taccgcacct gacgtgata ccctccacgt caaccacgaa accgcagaac 3660
tcgacttga ccacgcagcc tgcactgggt gtggcgcatg tggtgctgcc tgcctaacg 3720
gcgcagcaca cctgttcacc ggcgcaaagc ttgttcacct ctccctctc ccactgggta 3780
aggaagagcg cggactgcgt gcacgtaaga tggttgatga aatggaaacc aacttcggac 3840
actgctccct ctacggcgag tgcgcagatg tctgccccgc aggcatacca ctgaccgtg 3900
tggcagctgt caccaaggaa cgtgcgcgtg cagctttccg aggcaaagac gactagtctt 3960
taatccaagt aagtaccggt tcagacagtt aaaccagaaa gacgagtga caccatgtcc 4020
tccgcgaaaa agaaaccgc accggagcgt atgcactaca tcaagggtca tgtacctgtg 4080

```

<210> 2
 <211> 882
 <212> DNA
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(879)
 <223> sdhC

<400> 2

gtg ggg ttt tat gtc tct aaa cag cca gtt ggg ggt cat ggg gga gcg	48
Val Gly Phe Tyr Val Ser Lys Gln Pro Val Gly Gly His Gly Gly Ala	
1 5 10 15	
ccc cgt gac tgg tta atg ccc cga tct ggg acg tac agt aac aac gac	96
Pro Arg Asp Trp Leu Met Pro Arg Ser Gly Thr Tyr Ser Asn Asn Asp	
20 25 30	
act gga ggt gcc atg act gtt aga aat ccc gac cgt gag gca atc cgt	144
Thr Gly Gly Ala Met Thr Val Arg Asn Pro Asp Arg Glu Ala Ile Arg	
35 40 45	
cac gga aaa att acg acg gag gcg ctg cgt gag cgt ccc gca tac ccg	192
His Gly Lys Ile Thr Thr Glu Ala Leu Arg Glu Arg Pro Ala Tyr Pro	
50 55 60	
acc tgg gca atg aag ctg acc atg gcc atc act ggc cta atg ttt ggt	240
Thr Trp Ala Met Lys Leu Thr Met Ala Ile Thr Gly Leu Met Phe Gly	
65 70 75 80	
ggc ttc gtt ctt gtt cac atg atc gga aac ctg aaa atc ttc atg ccg	288
Gly Phe Val Leu Val His Met Ile Gly Asn Leu Lys Ile Phe Met Pro	
85 90 95	
gac tac gca gcc gat tct gcg cat ccg ggt gaa gca caa gta gat gtc	336
Asp Tyr Ala Ala Asp Ser Ala His Pro Gly Glu Ala Gln Val Asp Val	
100 105 110	
tac ggc gag ttc ctg cgt gag atc gga tcc ccg atc ctc cca cac ggc	384
Tyr Gly Glu Phe Leu Arg Glu Ile Gly Ser Pro Ile Leu Pro His Gly	
115 120 125	
tca gtc ctc tgg atc cta cgt att atc ctg ctg gtc gca ttg gtt ctg	432
Ser Val Leu Trp Ile Leu Arg Ile Ile Leu Leu Val Ala Leu Val Leu	
130 135 140	
cac atc tac tgt gca ttc gca ttg acc ggc cgt tct cac cag tcc ccg	480
His Ile Tyr Cys Ala Phe Ala Leu Thr Gly Arg Ser His Gln Ser Arg	
145 150 155 160	
gga aag ttc cgc cgt acc aac ctc gtt ggc ggc ttc aac tcc ttc gcg	528
Gly Lys Phe Arg Arg Thr Asn Leu Val Gly Gly Phe Asn Ser Phe Ala	
165 170 175	
acc cgc tcc atg ctg gtg acc gga atc gtt ctc ctt gcg ttc att atc	576
Thr Arg Ser Met Leu Val Thr Gly Ile Val Leu Leu Ala Phe Ile Ile	
180 185 190	
ttc cac atc ctc gac ctg acc atg ggt gtt gct cca gca gcc cca acc	624
Phe His Ile Leu Asp Leu Thr Met Gly Val Ala Pro Ala Ala Pro Thr	
195 200 205	
tca ttc gag cac ggc gaa gta tac gca aac atg gtg gct tcc ttt agc	672
Ser Phe Glu His Gly Glu Val Tyr Ala Asn Met Val Ala Ser Phe Ser	
210 215 220	
cgc tgg cct gta gca att tgg tac atc att gcc aac ctg gtc ctg ttc	720
Arg Trp Pro Val Ala Ile Trp Tyr Ile Ile Ala Asn Leu Val Leu Phe	
225 230 235 240	

gtc cac ctg tca cac ggc atc tgg ctt gca gtc tct gac ctg gga atc 768
 Val His Leu Ser His Gly Ile Trp Leu Ala Val Ser Asp Leu Gly Ile
 245 250 255

acc gga cgc cgc tgg agg gca atc ctc ctc gca gtt gcg tac atc gtt 816
 Thr Gly Arg Arg Trp Arg Ala Ile Leu Leu Ala Val Ala Tyr Ile Val
 260 265 270

cct gca ctg gtc ctg atc ggc aac atc acc att ccg ttc gcc atc gct 864
 Pro Ala Leu Val Leu Ile Gly Asn Ile Thr Ile Pro Phe Ala Ile Ala
 275 280 285

gtt ggc tgg att gcg taa 882
 Val Gly Trp Ile Ala
 290

<210> 3

<211> 293

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 3

Val Gly Phe Tyr Val Ser Lys Gln Pro Val Gly Gly His Gly Gly Ala
 1 5 10 15

Pro Arg Asp Trp Leu Met Pro Arg Ser Gly Thr Tyr Ser Asn Asn Asp
 20 25 30

Thr Gly Gly Ala Met Thr Val Arg Asn Pro Asp Arg Glu Ala Ile Arg
 35 40 45

His Gly Lys Ile Thr Thr Glu Ala Leu Arg Glu Arg Pro Ala Tyr Pro
 50 55 60

Thr Trp Ala Met Lys Leu Thr Met Ala Ile Thr Gly Leu Met Phe Gly
 65 70 75 80

Gly Phe Val Leu Val His Met Ile Gly Asn Leu Lys Ile Phe Met Pro
 85 90 95

Asp Tyr Ala Ala Asp Ser Ala His Pro Gly Glu Ala Gln Val Asp Val
 100 105 110

Tyr Gly Glu Phe Leu Arg Glu Ile Gly Ser Pro Ile Leu Pro His Gly
 115 120 125

Ser Val Leu Trp Ile Leu Arg Ile Ile Leu Leu Val Ala Leu Val Leu
 130 135 140

His Ile Tyr Cys Ala Phe Ala Leu Thr Gly Arg Ser His Gln Ser Arg
 145 150 155 160

Gly Lys Phe Arg Arg Thr Asn Leu Val Gly Gly Phe Asn Ser Phe Ala
 165 170 175

Thr Arg Ser Met Leu Val Thr Gly Ile Val Leu Leu Ala Phe Ile Ile
 180 185 190

Phe His Ile Leu Asp Leu Thr Met Gly Val Ala Pro Ala Ala Pro Thr
195 200 205

Ser Phe Glu His Gly Glu Val Tyr Ala Asn Met Val Ala Ser Phe Ser
210 215 220

Arg Trp Pro Val Ala Ile Trp Tyr Ile Ile Ala Asn Leu Val Leu Phe
225 230 235 240

Val His Leu Ser His Gly Ile Trp Leu Ala Val Ser Asp Leu Gly Ile
245 250 255

Thr Gly Arg Arg Trp Arg Ala Ile Leu Leu Ala Val Ala Tyr Ile Val
260 265 270

Pro Ala Leu Val Leu Ile Gly Asn Ile Thr Ile Pro Phe Ala Ile Ala
275 280 285

Val Gly Trp Ile Ala
290

<210> 4

<211> 1878

<212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1875)

<223> sdhA

<400> 4

atg aac ctg gtc tcc cca ctg aac cga cgc aag ttc cgt gtc ctc gtc 48
Met Asn Leu Val Ser Pro Leu Asn Arg Arg Lys Phe Arg Val Leu Val
1 5 10 15

gtt ggc acc ggc ctg tcc ggt ggt gct gca gca gca gcc ctc ggc gaa 96
Val Gly Thr Gly Leu Ser Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Leu Gly Glu
20 25 30

ctc gga tac gac gtc aag gcg ttc acc tac cac gac gca cct cgc cgt 144
Leu Gly Tyr Asp Val Lys Ala Phe Thr Tyr His Asp Ala Pro Arg Arg
35 40 45

gcg cac tcc att gct gca cag ggt ggc gtt aac tcc gcc cgc ggc aag 192
Ala His Ser Ile Ala Ala Gln Gly Gly Val Asn Ser Ala Arg Gly Lys
50 55 60

aag gta gac aac gac ggc gca tac cgc cac gtc aag gac acc gtc aag 240
Lys Val Asp Asn Asp Gly Ala Tyr Arg His Val Lys Asp Thr Val Lys
65 70 75 80

ggc ggc gac tac cgt ggt cgc gag tcc gac tgc tgg cgt ctc gcc gtc 288
Gly Gly Asp Tyr Arg Gly Arg Glu Ser Asp Cys Trp Arg Leu Ala Val
85 90 95

gag tcc gtc cgc gtc atc gac cac atg aac gcc atc ggt gca cca ttc	336
Glu Ser Val Arg Val Ile Asp His Met Asn Ala Ile Gly Ala Pro Phe	
100 105 110	
gcc cgc gaa tac ggt ggc gcc ttg gca acc cgt tcc ttc ggt ggt gtg	384
Ala Arg Glu Tyr Gly Gly Ala Leu Ala Thr Arg Ser Phe Gly Gly Val	
115 120 125	
cag gtc tcc cgt acc tac tac acc cgt gga caa acc gga cag cag ctg	432
Gln Val Ser Arg Thr Tyr Tyr Thr Arg Gly Gln Thr Gly Gln Gln Leu	
130 135 140	
cag ctc tcc acc gca tcc gca cta cag cgc cag atc cac ctc ggc tcc	480
Gln Leu Ser Thr Ala Ser Ala Leu Gln Arg Gln Ile His Leu Gly Ser	
145 150 155 160	
gta gaa atc ttc acc cat aac gaa atg gtt gac gtc att gtc acc gaa	528
Val Glu Ile Phe Thr His Asn Glu Met Val Asp Val Ile Val Thr Glu	
165 170 175	
cgt aac ggt gaa aag cgc tgc gaa ggc ctg atc atg cgc aac ctg atc	576
Arg Asn Gly Glu Lys Arg Cys Glu Gly Leu Ile Met Arg Asn Leu Ile	
180 185 190	
acc ggc gag ctc acc gca cac acc ggc cat gcc gtt atc ctg gca acc	624
Thr Gly Glu Leu Thr Ala His Thr Gly His Ala Val Ile Leu Ala Thr	
195 200 205	
ggt ggc tac ggc aac gtg tac cac atg tcc acc ctg gcc aag aac tcc	672
Gly Gly Tyr Gly Asn Val Tyr His Met Ser Thr Leu Ala Lys Asn Ser	
210 215 220	
aac gcc tcg gcc atc atg cgt gca tac gaa gcc ggc gca tac ttc gcg	720
Asn Ala Ser Ala Ile Met Arg Ala Tyr Glu Ala Gly Ala Tyr Phe Ala	
225 230 235 240	
tcc cca tcg ttc atc cag ttc cac cca acc ggc ctg cct gtg aac tcc	768
Ser Pro Ser Phe Ile Gln Phe His Pro Thr Gly Leu Pro Val Asn Ser	
245 250 255	
acc tgg cag tcc aag acc att ctg atg tcc gag tcg ctg cgt aac gac	816
Thr Trp Gln Ser Lys Thr Ile Leu Met Ser Glu Ser Leu Arg Asn Asp	
260 265 270	
ggc cgc atc tgg tcc cct aag gaa ccg aac gat aac cgc gat cca aac	864
Gly Arg Ile Trp Ser Pro Lys Glu Pro Asn Asp Asn Arg Asp Pro Asn	
275 280 285	
acc atc cct gag gat gag cgc gac tac ttc ctg gag cgc cgc tac cca	912
Thr Ile Pro Glu Asp Glu Arg Asp Tyr Phe Leu Glu Arg Arg Tyr Pro	
290 295 300	
gca ttc ggt aac ctc gtc cca cgt gac gtt gct tcc cgt gcg atc tcc	960
Ala Phe Gly Asn Leu Val Pro Arg Asp Val Ala Ser Arg Ala Ile Ser	
305 310 315 320	
cag cag atc aat gct ggt ctc ggt gtt gga cct ctg aac aac gct gca	1008
Gln Gln Ile Asn Ala Gly Leu Gly Val Gly Pro Leu Asn Asn Ala Ala	
325 330 335	

tac ctg gac ttc cgc gac gcc acc gag cgc ctc gga cag gac acc atc	1056
Tyr Leu Asp Phe Arg Asp Ala Thr Glu Arg Leu Gly Gln Asp Thr Ile	
340 345 350	
cgc gag cgt tac tcc aac ctc ttc acc atg tac gaa gag gca att ggc	1104
Arg Glu Arg Tyr Ser Asn Leu Phe Thr Met Tyr Glu Glu Ala Ile Gly	
355 360 365	
gag gac cca tac tcc agc cca atg cgt att gca ccg acc tgc cac ttc	1152
Glu Asp Pro Tyr Ser Ser Pro Met Arg Ile Ala Pro Thr Cys His Phe	
370 375 380	
acc atg ggt ggc ctc tgg act gac ttc aac gaa atg acg tca ctc cca	1200
Thr Met Gly Gly Leu Trp Thr Asp Phe Asn Glu Met Thr Ser Leu Pro	
385 390 395 400	
ggt ctg ttc tgc gca ggc gaa gca tcc tgg acc tac cac ggt gca aac	1248
Gly Leu Phe Cys Ala Gly Glu Ala Ser Trp Thr Tyr His Gly Ala Asn	
405 410 415	
cgt ctg ggc gca aac tcc ctg ctc tcc gct tcc gtc gat ggc tgg ttc	1296
Arg Leu Gly Ala Asn Ser Leu Leu Ser Ala Ser Val Asp Gly Trp Phe	
420 425 430	
acc ctg cca ttc acc atc cct aac tac ctc ggc cca ttg ctt ggc tcc	1344
Thr Leu Pro Phe Thr Ile Pro Asn Tyr Leu Gly Pro Leu Leu Gly Ser	
435 440 445	
gag cgt ctg tca gag gat gca cca gaa gca cag gca gcg att gcg cgt	1392
Glu Arg Leu Ser Glu Asp Ala Pro Glu Ala Gln Ala Ala Ile Ala Arg	
450 455 460	
gca cag gct cgc att gac cgc ctc atg ggc aac cgc cca gag tgg gtc	1440
Ala Gln Ala Arg Ile Asp Arg Leu Met Gly Asn Arg Pro Glu Trp Val	
465 470 475 480	
ggt gac aac gtt cac gga cct gag tac tac cac cgc cag ctt ggc gat	1488
Gly Asp Asn Val His Gly Pro Glu Tyr Tyr His Arg Gln Leu Gly Asp	
485 490 495	
atc ctg tac ttc tcc tgt ggc gtt tcc cga aac gta gaa gac ctc cag	1536
Ile Leu Tyr Phe Ser Cys Gly Val Ser Arg Asn Val Glu Asp Leu Gln	
500 505 510	
gat ggc atc aac aag atc cgt gcc ctc cgc gat gac ttc tgg aag aac	1584
Asp Gly Ile Asn Lys Ile Arg Ala Leu Arg Asp Asp Phe Trp Lys Asn	
515 520 525	
atg cgc atc acc ggc agc acc gat gag atg aac cag gtt ctc gaa tac	1632
Met Arg Ile Thr Gly Ser Thr Asp Glu Met Asn Gln Val Leu Glu Tyr	
530 535 540	
gca gca cgc gta gcc gac tac atc gac ctc ggc gaa ctc atg tgt gtc	1680
Ala Ala Arg Val Ala Asp Tyr Ile Asp Leu Gly Glu Leu Met Cys Val	
545 550 555 560	

gac gcc ctc gac cgc gac gag tcc tgt ggc gct cac ttc cgc gac gac 1728
 Asp Ala Leu Asp Arg Asp Glu Ser Cys Gly Ala His Phe Arg Asp Asp
 565 570 575

cac ctc tcc gaa gat ggc gaa gca gaa cgt gac gac gaa aac tgg tgc 1776
 His Leu Ser Glu Asp Gly Glu Ala Glu Arg Asp Asp Glu Asn Trp Cys
 580 585 590

ttc gtc tcc gca tgg gaa cca ggc gag aac gga acc ttc gtc cgc cac 1824
 Phe Val Ser Ala Trp Glu Pro Gly Glu Asn Gly Thr Phe Val Arg His
 595 600 605

gca gaa cca ctg ttc ttc gaa tcc gtc cca ctg cag aca agg aac tac 1872
 Ala Glu Pro Leu Phe Phe Glu Ser Val Pro Leu Gln Thr Arg Asn Tyr
 610 615 620

aag taa 1878
 Lys
 625

<210> 5

<211> 625

<212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 5

Met Asn Leu Val Ser Pro Leu Asn Arg Arg Lys Phe Arg Val Leu Val
 1 5 10 15

Val Gly Thr Gly Leu Ser Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Leu Gly Glu
 20 25 30

Leu Gly Tyr Asp Val Lys Ala Phe Thr Tyr His Asp Ala Pro Arg Arg
 : 35 40 45

Ala His Ser Ile Ala Ala Gln Gly Gly Val Asn Ser Ala Arg Gly Lys
 50 55 60

Lys Val Asp Asn Asp Gly Ala Tyr Arg His Val Lys Asp Thr Val Lys
 65 70 75 80

Gly Gly Asp Tyr Arg Gly Arg Glu Ser Asp Cys Trp Arg Leu Ala Val
 85 90 95

Glu Ser Val Arg Val Ile Asp His Met Asn Ala Ile Gly Ala Pro Phe
 100 105 110

Ala Arg Glu Tyr Gly Gly Ala Leu Ala Thr Arg Ser Phe Gly Gly Val
 115 120 125

Gln Val Ser Arg Thr Tyr Tyr Thr Arg Gly Gln Thr Gly Gln Gln Leu
 130 135 140

Gln Leu Ser Thr Ala Ser Ala Leu Gln Arg Gln Ile His Leu Gly Ser
 145 150 155 160

Val Glu Ile Phe Thr His Asn Glu Met Val Asp Val Ile Val Thr Glu
 165 170 175
 Arg Asn Gly Glu Lys Arg Cys Glu Gly Leu Ile Met Arg Asn Leu Ile
 180 185 190
 Thr Gly Glu Leu Thr Ala His Thr Gly His Ala Val Ile Leu Ala Thr
 195 200 205
 Gly Gly Tyr Gly Asn Val Tyr His Met Ser Thr Leu Ala Lys Asn Ser
 210 215 220
 Asn Ala Ser Ala Ile Met Arg Ala Tyr Glu Ala Gly Ala Tyr Phe Ala
 225 230 235 240
 Ser Pro Ser Phe Ile Gln Phe His Pro Thr Gly Leu Pro Val Asn Ser
 245 250 255
 Thr Trp Gln Ser Lys Thr Ile Leu Met Ser Glu Ser Leu Arg Asn Asp
 260 265 270
 Gly Arg Ile Trp Ser Pro Lys Glu Pro Asn Asp Asn Arg Asp Pro Asn
 275 280 285
 Thr Ile Pro Glu Asp Glu Arg Asp Tyr Phe Leu Glu Arg Arg Tyr Pro
 290 295 300
 Ala Phe Gly Asn Leu Val Pro Arg Asp Val Ala Ser Arg Ala Ile Ser
 305 310 315 320
 Gln Gln Ile Asn Ala Gly Leu Gly Val Gly Pro Leu Asn Asn Ala Ala
 325 330 335
 Tyr Leu Asp Phe Arg Asp Ala Thr Glu Arg Leu Gly Gln Asp Thr Ile
 340 345 350
 Arg Glu Arg Tyr Ser Asn Leu Phe Thr Met Tyr Glu Glu Ala Ile Gly
 355 360 365
 Glu Asp Pro Tyr Ser Ser Pro Met Arg Ile Ala Pro Thr Cys His Phe
 370 375 380
 Thr Met Gly Gly Leu Trp Thr Asp Phe Asn Glu Met Thr Ser Leu Pro
 385 390 395 400
 Gly Leu Phe Cys Ala Gly Glu Ala Ser Trp Thr Tyr His Gly Ala Asn
 405 410 415
 Arg Leu Gly Ala Asn Ser Leu Leu Ser Ala Ser Val Asp Gly Trp Phe
 420 425 430
 Thr Leu Pro Phe Thr Ile Pro Asn Tyr Leu Gly Pro Leu Leu Gly Ser
 435 440 445
 Glu Arg Leu Ser Glu Asp Ala Pro Glu Ala Gln Ala Ala Ile Ala Arg
 450 455 460

Ala Gln Ala Arg Ile Asp Arg Leu Met Gly Asn Arg Pro Glu Trp Val
 465 470 475 480
 Gly Asp Asn Val His Gly Pro Glu Tyr Tyr His Arg Gln Leu Gly Asp
 485 490 495
 Ile Leu Tyr Phe Ser Cys Gly Val Ser Arg Asn Val Glu Asp Leu Gln
 500 505 510
 Asp Gly Ile Asn Lys Ile Arg Ala Leu Arg Asp Asp Phe Trp Lys Asn
 515 520 525
 Met Arg Ile Thr Gly Ser Thr Asp Glu Met Asn Gln Val Leu Glu Tyr
 530 535 540
 Ala Ala Arg Val Ala Asp Tyr Ile Asp Leu Gly Glu Leu Met Cys Val
 545 550 555 560
 Asp Ala Leu Asp Arg Asp Glu Ser Cys Gly Ala His Phe Arg Asp Asp
 565 570 575
 His Leu Ser Glu Asp Gly Glu Ala Glu Arg Asp Asp Glu Asn Trp Cys
 580 585 590
 Phe Val Ser Ala Trp Glu Pro Gly Glu Asn Gly Thr Phe Val Arg His
 595 600 605
 Ala Glu Pro Leu Phe Phe Glu Ser Val Pro Leu Gln Thr Arg Asn Tyr
 610 615 620
 Lys
 625

<210> 6
 <211> 855
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(852)
 <223> sdhB

<400> 6
 gtg ctt cgt ctc cgc atg gga acc agg cga gaa cgg aac ctt cgt ccg 48
 Val Leu Arg Leu Arg Met Gly Thr Arg Arg Glu Arg Asn Leu Arg Pro
 1 5 10 15
 cca cgc aga acc act gtt ctt cga atc cgt ccc act gca gac aag gaa 96
 Pro Arg Arg Thr Thr Val Leu Arg Ile Arg Pro Thr Ala Asp Lys Glu
 20 25 30
 cta caa gta atg aaa ctt aca ctt gag atc tgg cgt caa gca ggc cca 144
 Leu Gln Val Met Lys Leu Thr Leu Glu Ile Trp Arg Gln Ala Gly Pro
 35 40 45

act gcg gaa ggc aag ttc gaa acc gtc cag gtt gac gac gcc gtc gcg	192
Thr Ala Glu Gly Lys Phe Glu Thr Val Gln Val Asp Asp Ala Val Ala	
50 55 60	
cag atg tcc atc ctg gag ctg ctt gac cac gta aac aac aag ttc atc	240
Gln Met Ser Ile Leu Glu Leu Leu Asp His Val Asn Asn Lys Phe Ile	
65 70 75 80	
gaa gaa ggc aaa gaa cca ttc gcg ttc gcc tct gac tgc cgc gaa ggc	288
Glu Glu Gly Lys Glu Pro Phe Ala Phe Ala Ser Asp Cys Arg Glu Gly	
85 90 95	
att tgt ggt acc tgt ggt ctc ctc gtg aac ggt cgc cct cac ggc gcc	336
Ile Cys Gly Thr Cys Gly Leu Leu Val Asn Gly Arg Pro His Gly Ala	
100 105 110	
gac cag aac aag cct gcc tgt gcg cag cgc ctg gtc agc tac aag gaa	384
Asp Gln Asn Lys Pro Ala Cys Ala Gln Arg Leu Val Ser Tyr Lys Glu	
115 120 125	
ggc gac acc ctc aag atc gaa cca ctg cgt tcc gcc gca tac cca gtg	432
Gly Asp Thr Leu Lys Ile Glu Pro Leu Arg Ser Ala Ala Tyr Pro Val	
130 135 140	
atc aag gac atg gtc gtc gac cgc tcc gca ctg gac cgt gtc atg gaa	480
Ile Lys Asp Met Val Val Asp Arg Ser Ala Leu Asp Arg Val Met Glu	
145 150 155 160	
cag ggt ggc tac gtg acc atc aac gca ggt acc gca cct gac gct gat	528
Gln Gly Gly Tyr Val Thr Ile Asn Ala Gly Thr Ala Pro Asp Ala Asp	
165 170 175	
acc ctc cac gtc aac cac gaa acc gca gaa ctc gca ctt gac cac gca	576
Thr Leu His Val Asn His Glu Thr Ala Glu Leu Ala Leu Asp His Ala	
180 185 190	
gcc tgc atc ggc tgt ggc gca tgt gtt gct gcc tgc cct aac ggc gca	624
Ala Cys Ile Gly Cys Gly Ala Cys Val Ala Ala Cys Pro Asn Gly Ala	
195 200 205	
gca cac ctg ttc acc ggc gca aag ctt gtt cac ctc tcc ctc ctc cca	672
Ala His Leu Phe Thr Gly Ala Lys Leu Val His Leu Ser Leu Leu Pro	
210 215 220	
ctg ggt aag gaa gag cgc gga ctg cgt gca cgt aag atg gtt gat gaa	720
Leu Gly Lys Glu Glu Arg Gly Leu Arg Ala Arg Lys Met Val Asp Glu	
225 230 235 240	
atg gaa acc aac ttc gga cac tgc tcc ctc tac ggc gag tgc gca gat	768
Met Glu Thr Asn Phe Gly His Cys Ser Leu Tyr Gly Glu Cys Ala Asp	
245 250 255	
gtc tgc ccc gca ggc atc cca ctg acc gct gtg gca gct gtc acc aag	816
Val Cys Pro Ala Gly Ile Pro Leu Thr Ala Val Ala Ala Val Thr Lys	
260 265 270	
gaa cgt gcg cgt gca gct ttc cga ggc aaa gac gac tag	855
Glu Arg Ala Arg Ala Ala Phe Arg Gly Lys Asp Asp	
275 280	

<210> 7
 <211> 284
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 7

```

Val Leu Arg Leu Arg Met Gly Thr Arg Arg Glu Arg Asn Leu Arg Pro
  1                      5                      10                      15

Pro Arg Arg Thr Thr Val Leu Arg Ile Arg Pro Thr Ala Asp Lys Glu
                20                      25                      30

Leu Gln Val Met Lys Leu Thr Leu Glu Ile Trp Arg Gln Ala Gly Pro
          35                      40                      45

Thr Ala Glu Gly Lys Phe Glu Thr Val Gln Val Asp Asp Ala Val Ala
  50                      55                      60

Gln Met Ser Ile Leu Glu Leu Leu Asp His Val Asn Asn Lys Phe Ile
  65                      70                      75                      80

Glu Glu Gly Lys Glu Pro Phe Ala Phe Ala Ser Asp Cys Arg Glu Gly
          85                      90                      95

Ile Cys Gly Thr Cys Gly Leu Leu Val Asn Gly Arg Pro His Gly Ala
          100                      105                      110

; Asp Gln Asn Lys Pro Ala Cys Ala Gln Arg Leu Val Ser Tyr Lys Glu
          115                      120                      125

Gly Asp Thr Leu Lys Ile Glu Pro Leu Arg Ser Ala Ala Tyr Pro Val
  130                      135                      140

Ile Lys Asp Met Val Val Asp Arg Ser Ala Leu Asp Arg Val Met Glu
  145                      150                      155                      160

Gln Gly Gly Tyr Val Thr Ile Asn Ala Gly Thr Ala Pro Asp Ala Asp
          165                      170                      175

Thr Leu His Val Asn His Glu Thr Ala Glu Leu Ala Leu Asp His Ala
          180                      185                      190

Ala Cys Ile Gly Cys Gly Ala Cys Val Ala Ala Cys Pro Asn Gly Ala
          195                      200                      205

Ala His Leu Phe Thr Gly Ala Lys Leu Val His Leu Ser Leu Leu Pro
  210                      215                      220

Leu Gly Lys Glu Glu Arg Gly Leu Arg Ala Arg Lys Met Val Asp Glu
  225                      230                      235                      240

Met Glu Thr Asn Phe Gly His Cys Ser Leu Tyr Gly Glu Cys Ala Asp
          245                      250                      255

Val Cys Pro Ala Gly Ile Pro Leu Thr Ala Val Ala Ala Val Thr Lys
          260                      265                      270

```


17.07.01

40

Glu Arg Ala Arg Ala Ala Phe Arg Gly Lys Asp Asp
275 280

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Izolovaný polynukleotid z koryneformných baktérií obsahujúci polynukleotidovú sekvenciu vybranú zo skupiny zahŕňajúcej

a) polynukleotid, ktorý je aspoň na 70 % identický s polynukleotidom, ktorý kóduje polypeptid, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu z SEQ ID No. 3,

b) polynukleotid, ktorý je aspoň na 70 % identický s polynukleotidom, ktorý kóduje polypeptid, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID No. 5,

c) polynukleotid, ktorý je aspoň na 70 % identický s polynukleotidom, ktorý kóduje polypeptid, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID No. 7,

d) polynukleotid, ktorý kóduje polypeptid, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu, ktorá je aspoň na 70 % identická s aminokyselinovou sekvenciou SEQ ID No. 3,

e) polynukleotid, ktorý kóduje polypeptid, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu, ktorá je aspoň na 70 % identická s aminokyselinovou sekvenciou SEQ ID No. 5,

f) polynukleotid, ktorý kóduje polypeptid, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu, ktorá je aspoň na 70 % identická s aminokyselinovou sekvenciou SEQ ID No. 7,

g) polynukleotid, ktorý je komplementárny k polynukleotidom a), b), c), d), e) alebo f), a

h) polynukleotid obsahujúci aspoň 15 za sebou nasledujúcich nukleotidov polynukleotidovej sekvencie a), b), c), d), e) alebo f).

2. Polynukleotid podľa nároku 1, pričom týmto polynukleotidom je prednostne rekombinantná DNA, replikovateľná v koryneformných baktériách.

3. Polynukleotid podľa nároku 1, pričom týmto polynukleotidom je RNA.

4. Replikovateľná DNA podľa nároku 2 obsahujúca:

- (i) nukleotidovú sekvenciu znázornenú v SEQ ID No. 1, alebo
- (ii) aspoň jednu sekvenciu, ktorá zodpovedá sekvencii (i) v oblasti degenerácie genetického kódu, alebo
- (iii) aspoň jednu sekvenciu, ktorá hybridizuje so sekvenciou komplementárnou k sekvencii (i) alebo (ii), a poprípade
- (iv) funkčne neutrálne mutácie so zmyslom v (i).

5. Polynukleotidová sekvencia podľa nároku 2, ktorá kóduje polypeptid, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu znázornenú v SEQ ID No. 2.

6. Vektor obsahujúci polynukleotidovú sekvenciu podľa nároku 1, najmä 1 h).

7. Koryneformná baktéria obsahujúca vektor podľa nároku 6.

8. Spôsob fermentačnej výroby L-aminokyselín, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa uskutočňujú nasledovné kroky:

a) fermentácia koryneformných baktérií produkujúcich L-aminokyselinu, v ktorých sa zoslabuje aspoň jeden z génov zvolených zo skupiny génov kódujúcich enzým sukcinátdehydrogenázu a jeho podjednotky A, B a C,

b) koncentrovanie L-aminokyseliny v médiu alebo v bunkách baktérií a

c) izolácia L-aminokyseliny.

9. Spôsob podľa nároku 8, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa používajú baktérie, v ktorých sa prídavne zosilňujú ďalšie gény pre biosyntetickú dráhu žiadanej L-aminokyseliny.

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

11. Spôsob podľa nároku 8, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa používa kmeň transformovaný plazmidovým vektorom a tento plazmidový vektor nesie nukleotidovú sekvenciu génu kódujúceho enzým sukcinátdehydrogenázu.

12. Spôsob podľa jedného alebo viacerých z predchádzajúcich nárokov 8 až 11, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa používajú koryneformné baktérie, ktoré produkujú L-lyzín.

13. Spôsob podľa nároku 9, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa súčasne nadmerne exprimuje gén dapA kódujúci dihydrodipikolinátsyntázu.

14. Spôsob podľa nároku 9, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa súčasne nadmerne exprimuje gén gap kódujúci glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázu.

15. Spôsob podľa nároku 9, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa súčasne nadmerne exprimuje gén pyc kódujúci pyruvátkarboxylázu.

16. Spôsob podľa nároku 9, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa súčasne nadmerne exprimuje gén mqo kódujúci malát-chinónoxidoreduktázu.

17. Spôsob podľa nároku 9, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa súčasne nadmerne exprimuje gén lysE kódujúci export L-lyzínu.

18. Spôsob podľa nároku 10, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa súčasne zoslabuje gén pgi kódujúci glukóza-6-fosfátizomerázu.

19. Spôsob podľa nároku 10, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa súčasne zoslabuje gén pck kódujúci fosfoenolpyruvátkarboxykinázu.