



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0027068

(51)⁷ C12P 13/10; C12N 15/09

(13) B

(21) 1-2012-03218

(22) 24/03/2011

(86) PCT/EP2011/054541 24/03/2011

(87) WO2011/124477 13/10/2011

(30) 10 2010 003 419.3 30/03/2010 DE

(45) 25/01/2021 394

(43) 25/02/2013 299A

(73) EVONIK OPERATIONS GMBH (DE)

Rellinghauser Straße 1-11, 45128 Essen, Germany

(72) CLAES, Wilfried (DE); GERSTMEIR, Robert (DE).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT L-ORNITHIN BẰNG CÁCH LÊN MEN

(57) Sáng chế đề xuất quy trình sản xuất L-ornithin bằng cách lên men sử dụng các vi sinh vật có hoạt tính cao trong việc chuyển vận axit amin ra ngoại bào.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề xuất quy trình sản xuất L-ornithin bằng cách lên men.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

L-Ornithin đã được biết đến là có tác dụng kích thích chức năng gan và thường được dùng làm một thành phần của thuốc và là chất dinh dưỡng dùng cho người chơi thể thao.

Ngày nay, L-Ornithin được điều chế theo nhiều quy trình khác nhau. Một trong số các phương pháp như vậy là phương pháp lên men bằng vi sinh vật. Một phương pháp khác là thủy phân arginin bằng chất kiềm, ví dụ như bằng bari hydroxit (CN 1594282 A). Một phương pháp nữa là biến đổi sinh học arginin bằng vi sinh vật cố định có hoạt tính arginaza (KR589121B1). Phương pháp điều chế L-ornithin từ L-axit aminoureidovaleric cũng đã được mô tả trong tài liệu sáng chế (JP 42007767 B4).

Các vi sinh vật có đặc tính tiết L-ornithin vào môi trường nuôi cấy đã được mô tả trong tài liệu. Ví dụ về các vi sinh vật như vậy là vi khuẩn thuộc giống *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus* (JP 43010996 B4, JP 57041912 B), *Escherichia* (US 3668072 A), *Providencia* (JP 03195494) hoặc *Arthrobacter* (US 3574061).

Các vi sinh vật sản xuất L-ornithin thường có đặc trưng là dinh dưỡng thụ động về các axit amin L-arginin hoặc L-axit aminoureidovaleric (ví dụ, đó là *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterium* như được mô tả trong EP 392708 B1 và KR 161147 B1 và *Escherichia* được mô tả trong US 366072 A). Ngoài ra, cũng đã biết các vi sinh vật có tính kháng đối với 2-thiazol-alanin, sulphaguanidin hoặc 2-flopyruvat (công bố đơn sáng chế Nhật số 61-119194). EP 0393708 B1 bộc lộ chủng sản xuất L-ornithin với đặc trưng là có tính kháng thấp đối với ornithol và axit mycophenolici. Vi sinh vật cũng có thể có kết hợp vài đặc tính nêu trên.

Quá trình giải phóng các axit amin kiềm chẳng hạn như L-lysin, L-arginin và L-ornithin qua đường khuếch tán thụ động từ tế bào là rất yếu (Bellmann et al.

(Microbiology 2001; 147: 1765-74)). Quá trình như vậy đã được mô tả kỹ lưỡng cho lysin trong các ví dụ. Vrljic et al. (Journal of Bacteriology 1995; 177(14): 4021-7) đã nghiên cứu nhiều thể đột biến *Corynebacterium glutamicum* không có cơ chế chuyển vận lysin ra ngoại bào. Với một thể đột biến, đo được nồng độ L-lysin trong tế bào là 174 mM, trong khi đó ở ngoại bào nồng độ chỉ đo được là 0,7 mM.

Vrljic et al. (Molecular Microbiology 1996; 22(5): 815-26 và Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 1999; 1: 327-336) và EP 0868527 B1 đã nhận diện và mô tả một chất chuyển vận mới là chất chuyển vận L-lysin ra ngoại bào (L-lysine exporter: LysE). Một thể đột biến được gọi là vô hiệu LysE nếu không có khả năng vận chuyển L-lysin ra ngoại bào. Polypeptit được mã hoá bởi gen *lysE* này có chiều dài gồm 233 axit amin hoặc gốc axit amin và được thể hiện trong SEQ ID No. 2. Sau khi có biểu hiện quá mức gen *lysE* ở chủng sản xuất lysin, nhận thấy có sự tăng tiết L-lysin.

Von Bellmann et al. (Microbiology 2001; 147: 1765-74) đã đặc tả chi tiết hơn chất chuyển vận ra ngoại bào LysE về khả năng chuyển vận các axit amin có tính kiềm khác nhau ở *C. glutamicum*. Các tác giả này đã chỉ ra rằng chất chuyển vận này chuyển vận đặc hiệu các axit amin L-lysin và L-arginin ra ngoại bào. Các tác giả này còn khảo sát xem liệu LysE có chuyển vận L-ornithin ra ngoại bào. Nhằm mục đích này, trước hết chuẩn bị một chủng *C. glutamicum* dinh dưỡng thụ động L-arginin được gọi là ATCC13032::argF.

Chủng này được nuôi cấy trong 50 ml (nuôi cấy gián đoạn) môi trường tối thiểu được gọi là CGXII chứa 40 g/l glucoza. Sau thời gian ủ là 24 giờ đo được lượng L-ornithin 60 mM, tương ứng với 7,9 g/l. Nồng độ L-ornithin trong nội bào đo được là vào khoảng 200 mM sau khi ủ chủng nêu trên trong thời gian khoảng 70 phút. Để làm sáng tỏ xem liệu LysE cũng có chuyển vận L-ornithin ra ngoại bào hay không, chủng 13032::argF này được biến nạp bằng plasmit có đặc tính sao chép pEC7lysE. Biện pháp này được dự định để tạo ra chủng có hoạt tính LysE tăng cao, để làm cho chủng này chuyển vận L-ornithin vào môi trường với mức chuyển vận ra ngoại bào cao hơn. Tuy nhiên, biện pháp này không làm gia tăng mức chuyển vận L-ornithin ra ngoại bào. Xác định được rằng cả chủng đối chứng (13032::argF) và chủng được biến nạp (13032::argF, gắn pEC7lysE) đều cùng cho một mức chuyển vận ra ngoại bào

(0,6 nmol phút⁻¹ (mg chất khô)⁻¹). Từ nghiên cứu này, các tác giả đã kết luận rằng chất chuyển vận ra ngoại bào LysE này không chuyển vận L-ornithin ra ngoại bào. Ngoài ra, các tác giả còn kết luận rằng ở *Corynebacterium glutamicum* phải có chức năng chuyển vận ra ngoại bào (tức là protein chuyển vận) khác chưa được biết đến cho L-ornithin (Bellmann et al., 2001, trang 1771, fig. 5b) và trang 1772, các dòng 21-28).

LysE biến thể (xem SEQ ID No. 4) được nhận diện trong *C. glutamicum* R, khác với trình tự axit amin của chất chuyển vận ra ngoại bào LysE từ chủng ATCC 13032, được thể hiện trên SEQ ID No. 2, ở chỗ đầu tận N có thêm ba gốc axit amin. Trình tự của các gốc axit amin này là: metionin, valin, isoleuxin (MVI). Polypeptit LysE từ chủng R này đã được mô tả trong EP 1266966 B1 như là biến thể khác với protein kiểu đại ở sự tạo thành vùng vòng nút hoặc, cụ thể hơn, là không thể tạo ra vòng nút nêu trên, và do đó có thể thực hiện sự chuyển vận L-lysin và L-arginin ra ngoại bào ở mức cao hơn.

Gunji và Yasueda (Journal of Biotechnology 127, 2006, 1-13) lại mô tả biến thể LysE khác. Các tác giả này quan tâm đến quá trình tạo thành L-lysin của một loài vi khuẩn thuộc nhóm dinh dưỡng methyl bắt buộc, đó là *Methylophilus methylotrophus*. Cụ thể là, các tác giả đã tiến hành biến nạp *M. methylotrophus* bằng plasmit được gọi là pSE chứa gen lysE của *C. glutamicum* ATCC13869 để cải thiện sự tạo thành lysin của *M. methylotrophus*. Tuy nhiên, các tác giả này đã nhận thấy là họ chỉ có thể tạo ra ở *M. methylotrophus* dạng đột biến của gen lysE (lysE24) một cách ổn định. Khung đọc mở của gen lysE này đã bị dịch chuyển ở alen lysE24 do bị xen gốc thymine, nên làm kết thúc khung đọc này sau 432 cặp bazơ. Khung đọc đã bị cắt cụt này mã hoá protein LysE, mà so với protein LysE kiểu đại của *C. glutamicum* ATCC13869, là ngắn hơn 92 gốc axit amin ở đầu tận C. Protein này có chiều dài gồm 141 gốc axit amin. Ngoài ra, 6 axit amin ở đầu tận C của protein bị cắt cụt này (các gốc 135-141) khác với các axit amin của trình tự axit amin LysE kiểu đại. Chủng *M. methylotrophus* mang alen LysE đã được cải biến trên plasmit (pSE24) được thử nghiệm để xác định khả năng tạo thành lysin. Cụ thể, chủng này được thử nghiệm trong 0,3 l môi trường tối thiểu được gọi là SEIIc với nuôi cấy theo kiểu gián đoạn bổ sung chất dinh dưỡng trong thời gian 50 giờ. Các tác giả này đã nhận thấy là thể biến nạp này còn tạo ra lượng nhỏ (0,07 mM tương ứng với 11,8 mg/l) L-ornithin ngoài 0,55 mM L-lysin và

0,19 mM L-arginin. Theo giải thích của các tác giả, sự tạo thành L-ornithin quan sát được này là do hoặc sự thay đổi tính đặc hiệu với cơ chất của chất chuyển vận đột biến này hoặc có thể do sự biến đổi nguồn L-arginin tạo ra trong nội bào của chủng này. EP 1266966 B1 (các tác giả: Gunji và Yasueda) mô tả rằng chất chuyển vận LysE24 này có tác động làm tăng sự tiết L-lysin và L-arginin.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là tạo ra quy trình mới để điều chế L-ornithin bằng phương pháp lên men.

Sáng chế đề xuất quy trình điều chế L-ornithin, khác biệt ở chỗ bao gồm các bước sau đây :

a) lên men vi khuẩn tiết L-ornithin được chọn từ nhóm bao gồm *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Arthrobacter* và *Enterobacteriaceae* có biểu hiện quá mức polynucleotit mã hoá polypeptit có hoạt tính như là chất chuyển vận L-ornithin ra ngoại bào và có trình tự axit amin ít nhất ($\geq$) 35%, $\geq$ 40%, $\geq$ 50%, $\geq$ 55%, $\geq$ 60%, $\geq$ 65%, $\geq$ 70%, $\geq$ 75%, $\geq$ 80%, $\geq$ 85%, $\geq$ 90%, $\geq$ 92%, $\geq$ 94%, $\geq$ 96%, $\geq$ 97%, $\geq$ 98%, $\geq$ 99% hoặc 100%, tốt hơn nếu $\geq$ 70%, đặc biệt tốt hơn nếu $\geq$ 90%, rất đặc biệt tốt hơn nếu $\geq$ 96%, và tốt nhất nếu 100%, đồng nhất với trình tự axit amin của SEQ ID No. 2, trong môi trường,

b) tích lũy L-ornithin nêu trên trong môi trường nêu trên, trong đó thu nhận môi trường lên men lỏng,

c) trong đó không sử dụng plasmit pEC71ysE, số lưu giữ DSM23239, để biểu hiện quá mức,

d) và trong đó chiều dài của polypeptit được mã hoá, nếu thích hợp, là $\geq$ 146 đến $\leq$ 286 axit amin hoặc gốc axit amin.

Ưu tiên lựa chọn khoảng chiều dài axit amin ở nhóm bao gồm $\geq$ 171 đến $\leq$ 286, $\geq$ 196 đến $\leq$ 261, $\geq$ 203 đến $\leq$ 258, $\geq$ 218 đến $\leq$ 243, $\geq$ 228 đến $\leq$ 236, và $\geq$ 228 đến $\leq$ 233 axit amin hoặc gốc axit amin.

Ưu tiên đặc biệt đến khoảng chiều dài

$\geq$ 203 đến $\leq$ 258, $\geq$ 218 đến $\leq$ 243, $\geq$ 228 đến $\leq$ 236, và $\geq$ 228 đến $\leq$ 233, và ưu

tiên rất đặc biệt đến khoảng chiều dài ≥ 228 đến ≤ 236 và ≥ 228 đến ≤ 233 .

Khi đề cập đến L-ornithin như sau đây, thuật ngữ này cũng bao gồm các muối của nó, ví dụ chẳng hạn như L-ornithin monohydroclorua hoặc L-ornithin sulphat.

Quy trình theo sáng chế sử dụng vi khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm giống *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Arthrobacter* và họ *Enterobacteriaceae*.

Trong giống *Corynebacterium*, ưu tiên dùng các chủng dựa trên loài sau đây:

Corynebacterium efficiens, ví dụ như chủng thuộc loại DSM44549,

Corynebacterium glutamicum, ví dụ như chủng thuộc loại ATCC13032 hoặc chủng R, và

Corynebacterium ammoniagenes, ví dụ như chủng ATCC6871,

với ưu tiên rất đặc biệt là loài *Corynebacterium glutamicum*.

Một số chủng đại diện thuộc loài *Corynebacterium glutamicum* còn được biết trong tình trạng kỹ thuật dưới các tên khác. Các chủng này bao gồm ví dụ:

chủng ATCC13870, được gọi là *Corynebacterium acetoacidophilum*,

chủng DSM20137, được gọi là *Corynebacterium lilium*,

chủng ATCC17965, được gọi là *Corynebacterium melassecola*,

chủng ATCC14067, được gọi là *Brevibacterium flavum*,

chủng ATCC13869, được gọi là *Brevibacterium lactofermentum*, và

chủng ATCC14020, được gọi là *Brevibacterium divaricatum*.

Thuật ngữ "*Micrococcus glutamicus*" cũng được dùng tương tự cho *Corynebacterium glutamicum*. Một số đại diện thuộc loài *Corynebacterium efficiens* cũng đã được gọi trong tình trạng kỹ thuật là *Corynebacterium thermoaminogenes*, ví dụ chủng FERM BP-1539.

Trong giống *Bacillus*, ưu tiên loài *Bacillus subtilis*.

Trong giống *Arthrobacter*, ưu tiên loài *Arthrobacter citreus*.

Trong họ *Enterobacteriaceae*, ưu tiên dùng giống *Escherichia*, *Erwinia*, *Providencia*, *Pantoea* và *Serratia*. Ưu tiên đặc biệt là giống *Escherichia* và *Serratia*.

Ưu tiên rất đặc biệt là loài *Escherichia coli* thuộc giống *Escherichia*, loài *Serratia marcescens* thuộc giống *Serratia*, và loài *Providencia rettgeri* thuộc giống *Providencia*.

Tốt hơn nếu vi khuẩn hoặc chủng (chủng ban đầu) được dùng cho biện pháp biểu hiện quá mức chất chuyển vận L-ornithin ra ngoại bào đã có khả năng tiết L-ornithin vào môi trường dinh dưỡng bao quanh chúng và tích lũy ở đó. Sau đây, thuật ngữ biểu hiện “sản xuất” cũng được sử dụng cho nghĩa này. Cụ thể hơn, chủng được sử dụng cho biện pháp biểu hiện quá mức nêu trên có khả năng cô đặc hoặc tích lũy trong môi trường dinh dưỡng $\geq 0,1$ g/l, $\geq 0,3$ g/l, ≥ 1 g/l, ≥ 3 g/l, ≥ 10 g/l L-ornithin. Tốt hơn nếu chủng ban đầu là chủng là chủng được tạo ra bằng cách gây đột biến và chọn lọc, bằng công nghệ ADN tái tổ hợp hoặc bằng cách kết hợp cả hai phương pháp này.

Điều là hiển nhiên và không cần phải giải thích thêm nữa là các vi khuẩn thích hợp cho các biện pháp theo sáng chế cũng có thể được thu nhận bằng cách trước hết biểu hiện quá mức polynucleotit mã hoá polypeptit có hoạt tính như là chất chuyển vận L-ornithin ra ngoại bào và có trình tự axit amin ít nhất $\geq 35\%$ đồng nhất với trình tự của SEQ ID No. 2, với chiều dài của polypeptit được mã hoá, nếu thích hợp, là trong khoảng chiều dài đã nêu trên, trong chủng hoang chẳng hạn như trong chủng thuộc loại *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 hoặc trong chủng ATCC 14067, và sau đó tác động lên vi khuẩn nêu trên, bằng các biện pháp di truyền nữa như được mô tả trong tình trạng kỹ thuật, để tạo ra L-ornithin. Việc biến nạp kiểu đại, chẳng hạn như chủng ATCC13032, ATCC14067, ATCC13869 hoặc ATCC17965, chỉ bằng polynucleotit được nêu trên không tạo ra được quy trình theo sáng chế.

Ví dụ về các chủng thuộc loài *Corynebacterium glutamicum* mà tiết ra hoặc sản xuất L-ornithin là:

Brevibacterium lactofermentum FERM-BP 2344, và *Corynebacterium glutamicum* FERM-BP 2345 như được mô tả trong US 5188947.

Ví dụ về chủng thuộc loài *Arthrobacter citreus* mà tiết ra hoặc sản xuất L-ornithin là:

Arthrobacter citreus FERM-BP 2342 như được mô tả trong US 5188947.

Ví dụ về chủng thuộc loài *Bacillus subtilis* mà tiết ra hoặc sản xuất L-ornithin là:

Bacillus subtilis BOR-32 (FERM-P 3647) như được mô tả trong JP 57041912.

Ví dụ về chủng thuộc loài *Providencia rettgeri* mà tiết ra hoặc sản xuất L-ornithin là:

Providencia rettgeri ARG6 (FERM P-11147) như được mô tả trong JP 03195494.

Ví dụ về chủng thuộc loài *Escherichia coli* mà tiết ra hoặc sản xuất L-ornithin là:

Escherichia coli B-19-19 (ATCC 21104) như được mô tả trong US 3668072.

Các vi khuẩn sản xuất L-ornithin thường là dinh dưỡng thụ động đối với các axit amin L-axit aminoureidovaleric hoặc L-arginin. Theo cách khác, cũng có thể tính đến việc dùng sinh vật kém phát triển khi không có nguồn dinh dưỡng L-axit aminoureidovaleric hoặc L-arginin làm vi khuẩn sản xuất L-orthinin. Định nghĩa của các thuật ngữ dinh dưỡng thụ động và kém phát triển khi không có nguồn dinh dưỡng nhất định có thể được xem, ví dụ, ở trang 9 của WO 01/09286. Trong lĩnh vực kỹ thuật này, các sinh vật kém phát triển khi thiếu nguồn dinh dưỡng nào đó còn được gọi là các đột biến không triệt để. Đặc biệt, vi khuẩn kém phát triển khi không có nguồn dinh dưỡng nhất định được sử dụng là các loại trong đó hoạt tính của các sản phẩm gen ArgF (ornithin carbamoyl transferaza), ArgG (argininosuccinat synthaza) hoặc ArgH (argininosuccinat lyaza) là cao hơn ($>$) 0 nhưng bằng hoặc nhỏ hơn ($\leq$) 10 %, tốt hơn nếu > 0 và $\leq 1\%$, so với hoạt tính của kiểu dại.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig 1 thể hiện sự sắp hàng của các trình tự axit amin của các protein LysE và ArgO được nêu ra trong Bảng 1. Khe sắp hàng được chỉ ra bằng “-”. Các axit amin đồng nhất được thể hiện bằng “*”.

Fig 2 là hình ảnh thể hiện thiết lập chương trình Clone Manager 9 từ phần mềm Scientific and Educational Software để xác định việc nhận diện hai trình tự axit amin bằng sự sắp hàng trình tự toàn cục.

Mô tả chi tiết sáng chế

Tình trạng kỹ thuật đã bộc lộ các polynucleotit được gọi là gen lysE và mã hóa cho protein hoặc polypeptit có hoạt tính của chất chuyển vận L-lysin ra ngoại bào. Các polypeptit này còn được viết tắt là LysE.

Chất chuyển vận ra ngoại bào là protein nằm ở màng tế bào và chuyển vận một sản phẩm trao đổi chất, ví dụ như L-lysin hoặc L-ornithin, từ bào lập của tế bào đó vào môi trường bao quanh. Nếu như năng lượng cần thiết cho quá trình này được tạo ra ở dạng adenosin triphosphat (ATP), thì quá trình này được gọi là sự chuyển vận hoặc chuyển vận ra ngoại bào chủ động nguyên phát. Quá trình này được gọi là sự chuyển vận hoặc chuyển vận ra ngoại bào chủ động thứ phát nếu năng lượng nêu trên được tạo ra ở dạng gradient ion, ví dụ như ion natri (Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko và L. Stryer; Biochemie [Biochemistry], 5th edition, các trang 378-384, Spektrum Akademischer Verlag [publisher], Heidelberg, Germany, 2003). Có thể tham khảo các chỉ dẫn cho việc xác định hoạt tính chuyển vận L-ornithin ra ngoại bào trong Bellmann et al. (Microbiology 2001; 147: 1765-74).

Trong quá trình nghiên cứu sáng chế, nhận thấy rằng chất chuyển vận lysin ra ngoại bào thuộc giống *Corynebacterium*, tốt hơn nếu *Corynebacterium glutamicum*, và *Micrococcus*, tốt hơn nếu *Micrococcus luteus*, có hoạt tính như là chất chuyển vận L-ornithin ra ngoại bào ngoài hoạt tính chuyển vận L-lysin ra ngoại bào.

Biện pháp theo sáng chế sử dụng gen mã hoá polypeptit có hoạt tính chuyển vận ra ngoài L-ornithin tế bào và có trình tự axit amin ít nhất ($\geq$) 35%, $\geq$ 40%, $\geq$ 50%, $\geq$ 55%, $\geq$ 60%, $\geq$ 65%, $\geq$ 70%, $\geq$ 75%, $\geq$ 80%, $\geq$ 85%, $\geq$ 90%, $\geq$ 92%, $\geq$ 94%, $\geq$ 96%, $\geq$ 97%, $\geq$ 98%, $\geq$ 99% hoặc 100%, tốt hơn nếu $\geq$ 70%, đặc biệt tốt hơn nếu $\geq$ 90%, rất đặc biệt tốt hơn nếu $\geq$ 96%, và tốt nhất nếu $\geq$ 100%, đồng nhất với trình tự axit amin của SEQ ID No. 2, với chiều dài của polypeptit được mã hoá, nếu thích hợp, nằm trong khoảng chiều dài được mô tả trên đây.

Ví dụ về các chất chuyển vận L-ornithin ra ngoại bào thích hợp là chất chuyển vận lysin ra ngoại bào hoặc polypeptit LysE của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 (SEQ ID No. 2), *Corynebacterium glutamicum* R (SEQ ID No. 4),

Corynebacterium glutamicum ATCC14067 (SEQ ID No. 5), *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 (SEQ ID No. 7), *Corynebacterium efficiens* YS-314 (SEQ ID No. 9), *Corynebacterium diphtheriae* NCTC 13129 (SEQ ID No. 10), *Corynebacterium striatum* ATCC6940 (SEQ ID No. 11), *Corynebacterium aurimucosum* ATCC700975 (SEQ ID No. 12), *Corynebacterium matruchotii* ATCC33806 (SEQ ID No. 13), *Corynebacterium pseudogenitalium* ATCC33035 (SEQ ID No. 14), *Corynebacterium accolens* ATCC49725 (SEQ ID No. 15), *Corynebacterium glucuronalyticum* ATCC 51867 (SEQ ID No. 16), *Micrococcus luteus* NCTC2665 (SEQ ID No. 17), *Corynebacterium tuberculostearicum* SK141 (SEQ ID No. 18) và *Corynebacterium matruchotii* ATCC14266 (SEQ ID No. 19). SEQ ID No. 18 và SEQ ID No. 19 trước đây trong lĩnh vực kỹ thuật này còn được gọi là polypeptit ArgO.

Trình tự nucleotit của gen *lysE* của *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 và *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 được xác định trong nghiên cứu này (SEQ ID No. 6 và SEQ ID No. 8). Trình tự axit amin của polypeptit LysE của *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 và *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 được thể hiện trên trên SEQ ID No. 5 và 7. Các trình tự này là đồng nhất với trình tự axit amin của LysE *C. glutamicum* ATCC13032, được thể hiện trên SEQ ID No. 2.

Bảng 1 liệt kê các số truy cập của các polypeptit LysE của các đại diện khác nhau của giống *Corynebacterium* và of *Micrococcus luteus*, được lấy từ dữ liệu của National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, US). Ngoài ra, Bảng 1 còn tham khảo đến các trình tự axit amin của polypeptit LysE được thể hiện trên trong danh mục trình tự. Cuối cùng, Bảng 1 thể hiện chiều dài (số axit amin) của polypeptit LysE được mã hoá.

Bảng 1

Vi khuẩn	SEQ ID No.	Số truy cập	Chiều dài polypeptit
<i>C. glutamicum</i>	2	YP_225551.1	233
<i>C. efficiens</i>	9	ZP_05749209.1	228

<i>C. diphtheriae</i>	10	NP_939452.1	228
<i>C. striatum</i>	11	ZP_03933958.1	222
<i>C. aurimucosum</i>	12	YP_002834652.1	235
<i>C. matruchotii</i>	13	ZP_03711883.1	244
<i>C. pseudogenitalium</i>	14	ZP_03922319.1	230
<i>C. accolens</i>	15	ZP_03931790.1	241
<i>C. glucuronolyticum</i>	16	ZP_03918361.1	261
<i>M. luteus</i>	17	YP_002958101.1	204
<i>C. tuberculostearicum</i>	18	ZP_05365683.1	230
<i>C. matruchotii</i>	19	ZP_04835056.1	244

Fig 1 thể hiện sự sắp hàng nhiều trình tự của các trình tự axit amin của polypeptit LysE của các vi khuẩn được nêu ra trong Bảng 1. Sự sắp hàng các trình tự axit amin được thể hiện trên Fig 1 được thực hiện nhờ chương trình Clone Manager 9 Professional Edition (Scientific & Educational Software 600 Pinner Weald Way Ste 202 Cary NC 27513 USA). Phân tử tham chiếu được sử dụng cho sự sắp hàng là polypeptit LysE (LysE) của ATCC13032. Để đánh giá điểm của ma trận, lựa chọn thiết lập “Blosum 62” (xem: Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko và L. Stryer; Biochemie, 5th edition, các trang 194-197, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Germany, 2003)).

Ngoài ra, nếu thích hợp, cũng có thể sử dụng các chương trình như được mô tả trong tình trạng kỹ thuật, chẳng hạn như chương trình ClustalX (Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. và Higgins, D.G. (1997). Giao diện của sổ ClustalX: các phương pháp linh hoạt cho sự sắp hàng nhiều trình tự được trợ giúp bởi các công cụ phân tích hiệu quả. Nucleic Acids Research, 25: 4876-4882).

Các gốc axit amin 4-236 của polypeptit LysE của *Corynebacterium glutamicum* R (xem SEQ ID No. 4) tương ứng với trình tự axit amin của LysE *C. glutamicum* ATCC13032 được thể hiện trên SEQ ID No. 2. Polypeptit *C. glutamicum* R có thêm trình tự ba gốc axit amin ở đầu tận N (metionin-valin-isoleuxin). Các gốc bổ sung này được tạo ra khi 9 cặp bazơ nằm ở codon bắt đầu nằm ở phía trước nữa gen lysE được sử dụng như là thay thế cho codon bắt đầu của gen

lysE trong *C. glutamicum* ATCC13032 (xem SEQ ID No. 1).

Trình tự axit amin của polypeptit LysE của *C. efficiens* YS-314 là 71%, và trình tự của *C. diphtheriae* NCTC 13129 là 44%, trình tự của *Corynebacterium striatum* ATCC6940 là 44%, trình tự của *Corynebacterium aurimucosum* ATCC700975 là 42%, trình tự của *Corynebacterium matruchotii* ATCC33806 là 43%, trình tự của *Corynebacterium pseudogenitalium* ATCC33035 là 43%, trình tự của *Corynebacterium accolens* ATCC49725 là 43%, trình tự của *Corynebacterium glucuronalyticum* ATCC 51867 là 36%, trình tự của *Micrococcus luteus* NCTC2665 là 40%, đồng nhất với trình tự axit amin LysE của *C. glutamicum* ATCC13032 được thể hiện trên SEQ ID No. 2. Ngoài ra, trình tự axit amin của polypeptit ArgO của *C. tuberculostearicum* SK141 là 43% đồng nhất với trình tự axit amin của SEQ ID No. 2. Ngoài ra, trình tự axit amin của polypeptit ArgO của *C. matruchotii* ATCC14266 là 44% đồng nhất với trình tự axit amin của SEQ ID No. 2. Các giá trị phần trăm đồng nhất này được tạo ra nhờ sự sắp hàng trình tự toàn cục dùng chương trình Clone Manager 9 bằng cách dùng thiết lập Blossum 62 (xem fig. 2).

Các gen lysE, tức là các polynucleotit mã hoá polypeptit có hoạt tính như là chất chuyển vận L-ornithin ra ngoại bào, có thể được phân lập ra khỏi sinh vật nhờ phản ứng chuỗi polymeaza (PCR) sử dụng các đoạn mồi thích hợp. Có thể tham khảo các chỉ dẫn trong sổ tay phòng thí nghiệm “PCR” của Newton và Graham (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Germany, 1994), và trong WO 2006/100211 ở các trang 14 đến 17, ngoài ra là các tài liệu khác.

Ưu tiên đặc biệt cho quy trình theo sáng chế là sử dụng các gen mã hoá polypeptit có hoạt tính chuyển vận L-ornithin ra ngoại bào và có trình tự axit amin bao gồm một hoặc nhiều đặc điểm được chọn từ nhóm bao gồm

- a) trình tự axit amin theo SEQ ID No. 2 hoặc SEQ ID No. 4,
- b) trình tự axit amin theo SEQ ID No. 2, bao gồm một hoặc nhiều, lên đến 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, hoặc 1, khuyết đoạn axit amin,
- c) trình tự axit amin theo SEQ ID No. 2, bao gồm một hoặc nhiều, lên đến 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, hoặc 1, cài xen axit amin, và
- d) trình tự axit amin theo SEQ ID No. 2, bao gồm một hoặc nhiều, lên đến

140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, hoặc 1, tốt hơn nếu lên đến 5, 4, 3, 2, hoặc 1, thay thế axit amin.

e) trình tự axit amin theo SEQ ID No. 2, bao gồm một hoặc nhiều, lên đến 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, hoặc 1, tốt hơn nếu lên đến 5, 4, 3, 2, hoặc 1, bổ sung axit amin ở đầu tận N và/hoặc ở đầu tận C.

Nếu thích hợp, ưu tiên thực hiện thay thế axit amin bảo toàn. Trong trường hợp axit amin thơm, thay thế bảo toàn là các thay thế trong đó phenylalanin, tryptophan và tyrosin được thay thế cho nhau. Trong trường hợp axit amin kỵ nước, các thay thế bảo toàn là các thay thế trong đó leucin, isoleucin và valin được thay thế cho nhau. Trong trường hợp các axit amin phân cực, các thay thế bảo toàn là các thay thế trong đó glutamin và asparagin được thay thế cho nhau. Trong trường hợp các axit amin có tính kiềm, các thay thế bảo toàn là các thay thế trong đó arginin, lysin và histidin được thay thế cho nhau. Trong trường hợp các axit amin có tính axit, các thay thế bảo toàn là các thay thế trong đó axit aspartic và axit glutamic được thay thế cho nhau. Trong trường hợp các axit amin chứa nhóm hydroxyl, các thay thế bảo toàn là các thay thế trong đó serin và threonin được thay thế cho nhau.

Ngoài ra, có thể sử dụng các polynucleotit mà lai ở điều kiện nghiêm ngặt với trình tự nucleotit bổ trợ với SEQ ID No. 1, tốt hơn nếu là vùng mã hoá của SEQ ID No. 1, và mã hóa cho polypeptit có hoạt tính chuyển vận L-ornithin ra ngoại bào, với trình tự axit amin của protein được mã hoá $\geq 70\%$ đồng nhất với trình tự axit amin của SEQ ID No. 2 và có chiều dài của polypeptit được mã hoá, nếu thích hợp, nằm trong khoảng chiều dài được đề cập trên đây.

Các chỉ dẫn cho việc lai lần lượt các axit nucleic và polynucleotit, có thể được tham khảo trong các tài liệu của chuyên gia trong lĩnh vực, ngoài ra còn có các tài liệu khác, ví dụ trong sổ tay “The DIG System Users Guide for Filter Hybridization” from Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Germany, 1993) và in Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). Quá trình lai xảy ra ở điều kiện nghiêm ngặt, tức là quá trình tạo ra chỉ các thể lai trong đó mẫu dò, tức là polynucleotit chứa trình tự nucleotit bổ trợ với SEQ ID No. 1, tốt hơn nếu là vùng mã hoá của SEQ ID No. 1, và trình tự đích, tức là các polynucleotit được xử lý bằng hoặc được nhận diện bằng mẫu dò nêu trên, ít nhất 70% đồng nhất. Mức độ

nghiêm ngặt của quá trình lai, bao gồm các bước rửa, đã được biết là chịu ảnh hưởng hoặc được quyết định bằng cách thay đổi thành phần dung dịch đệm, nhiệt độ và nồng độ muối. Phản ứng lai này thường được thực hiện trong điều kiện nghiêm ngặt tương đối thấp so với các bước rửa (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

Ví dụ, có thể sử dụng dung dịch đệm $5\times$ SSC ở nhiệt độ vào khoảng 50°C - 68°C cho phản ứng lai. Trong trường hợp này, mẫu dò cũng có thể lai với polynucleotit có mức đồng nhất với trình tự nucleotit của mẫu dò được sử dụng là nhỏ hơn 70%. Các thể lai như vậy là kém bền hơn và được loại ra bằng cách rửa ở điều kiện nghiêm ngặt. Quá trình này có thể được thực hiện, ví dụ bằng cách giảm nồng độ muối xuống $2\times$ SSC hoặc $1\times$ SSC và, nếu thích hợp, sau đó là $0,5\times$ SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany, 1995), với nhiệt độ được thiết lập vào khoảng 50°C - 68°C , vào khoảng 52°C - 68°C , vào khoảng 54°C - 68°C , vào khoảng 56°C - 68°C , vào khoảng 58°C - 68°C , vào khoảng 60°C - 68°C , vào khoảng 62°C - 68°C , vào khoảng 64°C - 68°C , vào khoảng 66°C - 68°C . Ưu tiên là khoảng nhiệt độ vào khoảng 64°C - 68°C hoặc vào khoảng 66°C - 68°C . Tùy ý có thể giảm nồng độ muối đến nồng độ tương ứng với $0,2\times$ SSC hoặc $0,1\times$ SSC. Dung dịch đệm SSC tùy ý chứa natri dodecyl sulphat (SDS) ở nồng độ 0,1%. Bằng cách tăng dần nhiệt độ lai ở các bước vào khoảng $1-2^{\circ}\text{C}$ từ 50°C đến 68°C , có thể phân lập các mảnh polynucleotit ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 92%, ít nhất 94%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99%, nếu thích hợp 100%, đồng nhất với trình tự hoặc trình tự bổ trợ của mẫu dò được sử dụng và mã hóa cho polypeptit có hoạt tính chuyển vận L-ornithin ra ngoại bào. Các chỉ dẫn thêm nữa liên quan đến quá trình lai có thể có được từ "các bộ kit" ở trên thị trường (ví dụ DIG Easy Hyb từ Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, Catalogue No. 1603558).

Đối với các biện pháp theo sáng chế, polynucleotit mã hoá protein có hoạt tính chuyển vận L-ornithin ra ngoại bào được biểu hiện quá mức trong vi khuẩn hoặc chủng ban đầu hoặc chủng cha mẹ sản xuất L-ornithin, với trình tự axit amin của protein được mã hoá là $\geq 35\%$ đồng nhất với trình tự axit amin của SEQ ID No. 2 và chiều dài của polypeptit được mã hoá, nếu thích hợp, là nằm trong phạm vi được nêu

trên.

Biểu hiện quá mức thường dùng để chỉ sự tăng về nồng độ trong tế bào hoặc hoạt tính của axit ribonucleic, của protein (polypeptit) hoặc của enzym so với chủng ban đầu (chủng cha mẹ) hoặc chủng kiểu đại, nếu chủng sau này là chủng ban đầu. Chủng ban đầu (chủng cha mẹ) dùng để chỉ chủng mà trên đó biện pháp dẫn đến biểu hiện quá mức đã được thực hiện.

Các thuật ngữ protein và polypeptit được xem như là có thể dùng thay cho nhau.

Để biểu hiện quá mức, ưu tiên dùng phương pháp biểu hiện quá mức tái tổ hợp. Các phương pháp này bao gồm các phương pháp bất kỳ trong đó vi sinh vật được tạo ra bằng cách sử dụng phân tử ADN được tạo in vitro. Ví dụ về các phân tử ADN như vậy bao gồm vùng khởi đầu, caxet biểu hiện, gen, alen, vùng mã hoá, v.v. Các phân tử này được chuyển vào vi sinh vật mong muốn bằng phương pháp biến nạp, tiếp hợp, tải nạp hoặc các phương pháp tương tự.

Biện pháp biểu hiện quá mức là gia tăng hoạt tính hoặc nồng độ của polypeptit tương ứng thông thường đến mức ít nhất 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% hoặc 500%, tốt hơn nếu đến mức lên đến 1000%, 2000%, 4000%, 10000% hoặc 20000%, tính theo mức hoạt tính hoặc nồng độ của polypeptit nêu trên ở chủng này trước khi tiến hành biện pháp tạo ra biểu hiện quá mức.

Khi sử dụng các chủng thuộc loài *Corynebacterium glutamicum*, hoạt tính chuyển vận L-ornithin ra ngoài bào ở chủng ATCC13032 hoặc ATCC14067 hoặc ATCC13869 hoặc ATCC17965, nếu thích hợp, là các điểm tham khảo thích hợp để xác định biểu hiện quá mức. Khi sử dụng chủng dựa trên hoặc thu được từ ATCC13032, chủng ATCC13032 nêu trên là điểm tham khảo thích hợp. Một ví dụ về điều này là chủng được điều chế trong tiến trình dẫn đến sáng chế, ATCC13032_Delta_argFRGH/pVWEx1_lysE, là chủng trên cơ sở chủng ATCC13032. Khi sử dụng chủng dựa trên hoặc thu được từ ATCC14067, chủng ATCC14067 nêu trên là điểm tham khảo thích hợp. Khi sử dụng chủng dựa trên hoặc thu được từ ATCC13869, chủng ATCC13869 nêu trên là điểm tham khảo thích hợp. Các điểm tham khảo thích hợp khác được tạo ra tương ứng.

Khi sử dụng chủng thuộc loài *Escherichia coli*, tốt hơn nếu là chủng *Escherichia coli* K12, hoạt tính chuyển vận L-ornithin ra ngoại bào ở chủng MG1655, nếu thích hợp, là điểm tham khảo thích hợp để xác định biểu hiện quá mức.

Biểu hiện quá mức được thực hiện bằng nhiều phương pháp đã biết trong tình trạng kỹ thuật.

Các phương pháp này bao gồm gia tăng số lượng bản sao và cải biến trình tự nucleotit hướng đến hoặc kiểm soát biểu hiện của gen. Quá trình phiên mã một gen được kiểm soát bởi vùng khởi đầu và tùy ý bởi protein ức chế (protein là chất kìm hãm) hoặc thúc đẩy (protein là chất hoạt hoá) quá trình phiên mã, ngoài ra còn các yếu tố khác. Sự dịch mã ARN tạo ra được kiểm soát bởi vị trí gắn kết với ribosom và codon bắt đầu, ngoài ra còn các yếu tố khác. Các polynucleotit hoặc phân tử ADN bao gồm vùng khởi đầu và vị trí gắn kết với ribosom và tùy ý codon bắt đầu còn được gọi là caxet biểu hiện.

Các phương pháp nêu trên còn bao gồm việc sử dụng các biến thể của polypeptit hoặc enzym, có hoạt tính xúc tác nâng cao.

Có thể làm tăng số lượng bản sao nhờ plasmit mà sao chép trong bào lập của vi khuẩn. Với mục đích này, trong tình trạng kỹ thuật đã mô tả nhiều plasmit cho các nhóm vi sinh vật rất khác nhau, các plasmit này có thể được sử dụng để làm gia tăng số lượng bản sao của gen như mong muốn. Các plasmit thích hợp cho giống *Escherichia* được mô tả, ví dụ như, trong sổ tay Molecular Biology, Labfax (Ed.: T.A. Brown, Bios Scientific, Oxford, UK, 1991). Các plasmit thích hợp cho giống *Corynebacterium* được mô tả, ví dụ như, trong Tauch et al. (Journal of Biotechnology 104 (1-3), 27-40, (2003)) hoặc trong Stansen et al. (Applied and Environmental Microbiology 71, 5920-5928 (2005)).

Việc sử dụng plasmit pEC7lysE, đã được nộp lưu ở DSM 23239, để gia tăng số lượng bản sao trong chủng *Corynebacterium glutamicum* được loại trừ ra ngoài biện pháp dẫn đến sáng chế. Trình tự nucleotit của plasmit pEC7lysE được xác định và được thể hiện ở SEQ ID No. 29.

Ngoài ra, số lượng bản sao còn có thể được tăng lên đến mức ít nhất một (1) bản sao bằng cách đưa thêm các bản sao nữa vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn này. Các

phương pháp thích hợp đối với giống *Corynebacterium*, tốt hơn nếu là *Corynebacterium glutamicum*, được mô tả, ví dụ như, trong các patent WO 03/014330, WO 03/040373 và WO 04/069996. WO 03/014330 mô tả các phương pháp để nhân đôi thể nối tiếp của các gen ở locus gen nguyên thể. WO 03/040373 mô tả các phương pháp để kết hợp bản sao thứ hai hoặc thứ ba ở các locus gen nữa, với locus gen cụ thể này là không thiết yếu cho sự phát triển hoặc sản xuất axit amin nhất định, L-ornithin trong trường hợp của sáng chế. Ví dụ về các locus gen thích hợp để kết hợp bản sao thứ hai hoặc tiếp theo của gen *lysE* trong quy trình theo sáng chế là các gen *odh*, *sucA*, *dapA*, *dapB*, *ddh*, *lysA*, *argR*, *argF*, *argG* và *argH*. WO 04/069996 (xem các Bảng 12 và 13) mô tả các vùng xen gen và gen mã hoá các thể thực khuẩn hoặc các hợp phần của thể thực khuẩn của *C. glutamicum*, là thích hợp để kết hợp các bản sao nữa của gen *lysE*.

Ví dụ về các phương pháp thích hợp cho giống *Escherichia* là sự kết hợp bản sao gen vào vị trí att của thể thực khuẩn (Yu and Court, Gene 223, 77-81 (1998)), khuếch đại nhiễm sắc thể nhờ thể thực khuẩn Mu, như được mô tả trong EP 0 332 448, hoặc phương pháp thay thế gen nhờ plasmit sao chép có điều kiện, như mô tả bởi: Hamilton et al. (Journal of Bacteriology 174, 4617-4622 (1989)) hoặc Link et al. (Journal of Bacteriology 179, 6228-6237 (1997)).

Ngoài ra, sự biểu hiện gen có thể được tăng lên bằng cách sử dụng vùng khởi đầu mạnh mà được liên kết về mặt chức năng với gen sẽ được biểu hiện. Ưu tiên sử dụng vùng khởi đầu mà là mạnh hơn vùng khởi đầu tự nhiên, tức là gen có mặt trong kiểu đại hoặc chủng cha mẹ. Với mục đích này, tình trạng kỹ thuật đã mô tả rất nhiều phương pháp.

Có thể tham khảo các vùng khởi đầu và hệ thống biểu hiện thích hợp cho giống *Corynebacterium* trong các patent, ngoài ra còn các tài liệu khác, EP 0 629 699 A2, US 2007/0259408 A1 (vùng khởi đầu gap), WO 2006/069711, EP 1 881 076 A1, WO 2008/088158, WO 2009/025470 (vùng khởi đầu *butA*, vùng khởi đầu *pyk*), US 6,861,246 (các biến thể MC20 và MA16 của vùng khởi đầu *dapA*), và EP 1 918 378 A1 (vùng khởi đầu *sod*), và trong các tài liệu bình luận chẳng hạn “Handbook of *Corynebacterium glutamicum*” (Eds.: Lothar Eggeling and Michael Bott, CRC Press, Boca Raton, US (2005)), hoặc sách “*Corynebacteria, Genomics and*

Molecular Biology” (Ed.: Andreas Burkovski, Caister Academic Press, Norfolk, UK (2008)). Ví dụ về các vùng khởi đầu mà cho phép sự biểu hiện có kiểm soát, tức là chịu cảm ứng hoặc có thể ức chế được, được mô tả, ví dụ như trong tài liệu: Tsuchiya and Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)).

Các vùng khởi đầu thích hợp cho giống *Escherichia* đã được biết đến từ lâu. Các gen này bao gồm, ngoài ra còn có các gen khác, vùng khởi đầu cổ điển như vùng khởi đầu lac, vùng khởi đầu trp, các vùng khởi đầu thể lai như tac và trc, vùng khởi đầu PL và PR của thể thực khuẩn λ . Tương tự, có thể sử dụng các vùng khởi đầu của thể thực khuẩn T7, các vùng khởi đầu gear-box, vùng khởi đầu nar hoặc các vùng khởi đầu của các gen rrsG, rnpB, csrA, csrB, ompA, fusA, pepQ, rplX hoặc rpsG. Sự biểu hiện có kiểm soát được cho phép, ví dụ, bởi hệ cI857-PR hoặc cI857-PL của thể thực khuẩn λ (Götting et al., BioTechniques 24, 362-366 (1998)). Các tài liệu tổng quan có thể được xem trong Makrides (Microbiological Reviews 60(3), 512-538 (1996)) hoặc trong sổ tay “*Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology” (F.C. Neidhardt (Editor in Chief), ASM Press, Washington, US (1996)).

Các vùng khởi đầu hoặc caxet biểu hiện như vậy thường được sử dụng ở khoảng cách từ 1 đến 1000, tốt hơn nếu từ 1 đến 500, nucleotit ở phía trước nucleotit đầu tiên của codon bắt đầu của vùng mã hoá cả gen. Ở khoảng cách 1 có nghĩa là vùng khởi đầu hoặc caxet biểu hiện nằm ngay phía trước bazơ đầu tiên của codon bắt đầu của vùng mã hoá.

Để gia tăng biểu hiện của gen lysE ở *C. glutamicum*, ưu tiên cài xen các vùng khởi đầu thích hợp chẳng hạn như vùng khởi đầu sod của *C. glutamicum* (xem SEQ ID No. 1 của EP 1918 378 A1) hoặc vùng khởi đầu gap của *C. glutamicum* (xem SEQ ID No. 3 của US 2007/0259408) nằm giữa các vị trí 930 và 990 của SEQ ID No. 1.

Khi sử dụng caxet biểu hiện chứa vùng khởi đầu và vị trí gắn kết với ribosom (RBS), chẳng hạn như đơn vị biểu hiện của gen sod của *C. glutamicum* (xem SEQ ID No. 2 của EP 1918 378 A1) hoặc đơn vị biểu hiện của gen gap *C. glutamicum*, như được mô tả trong US 2007/0259408 và được thể hiện trên SEQ ID No. 28 (và được nêu trong bản mô tả này là PgapRBS), ví dụ, các caxet này được cài xen, trong trường hợp của *C. glutamicum*, tốt hơn nếu nằm giữa các vị trí 930 và 1001, đặc biệt tốt hơn nếu nằm giữa các vị trí 1000 và 1001, of SEQ ID No. 1. Một ví dụ về vị trí gắn kết với

ribosom thích hợp trong caxet biểu hiện như vậy là trình tự nucleotit 5'-agaaaggagg-3' đã được Amador chỉ ra (Microbiology 145, 915-924 (1999)).

Tương tự, có thể đặt nhiều vùng khởi đầu ở phía trước gen mong muốn hoặc liên kết về mặt chức năng chúng với gen sẽ được biểu hiện và bằng cách này đạt được sự tăng biểu hiện. Quá trình này được mô tả, ví dụ trong WO 2006/069711.

Cấu trúc của các vùng khởi đầu *Corynebacterium glutamicum* và *Escherichia coli* đã được biết rõ. Do đó, có thể gia tăng cường độ của vùng khởi đầu bằng cách cải biến trình tự của nó bằng một hoặc nhiều thay thế và/hoặc một hoặc nhiều cài xen và/hoặc một hoặc nhiều khuyết nucleotit. Có thể tham khảo ví dụ về các biện pháp này trong “Herder Lexikon der Biologie” [Herder’s Encyclopaedia of Biology] (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Germany, ngoài ra là các tài liệu khác nữa.

Theo đó, biện pháp thích hợp để biểu hiện quá mức gen *lysE* là cải biến hoặc làm mất chức năng vùng khởi đầu của gen *lysE* nêu trên.

Tương tự, cấu trúc của các vị trí gắn kết với ribosom của *Corynebacterium glutamicum* và *Escherichia coli* là đã biết và được mô tả, ví dụ trong Amador (Microbiology 145, 915-924 (1999)), và trong các sổ tay và sách giáo khoa về di truyền, ví dụ như “Gen und Klone” “Gene und Klone” [Genes and Clones] (Winnacker, Verlag Chemie, Weinheim, Germany (1990)) hoặc “Molecular Genetics of Bacteria” (Dale and Park, Wiley and Sons Ltd., Chichester, UK (2004)). Các gen được biểu hiện rõ, tức là các gen cấu trúc quan trọng nhất trong sinh vật, có vị trí gắn kết với ribosom tốt (Amador, Microbiology 145, 915-924 (1999)), tức là gen cấu trúc này là rất tương tự hoặc tương ứng với trình tự liên ứng. Các tài liệu đã chỉ ra rằng các gen có độ biểu hiện cao có vị trí gắn kết với ribosom tốt (Karlin và Mrázek, Journal of Bacteriology 2000; 182(18): 5238-50). Kết quả là, có thể đạt được sự dịch mã có hiệu quả của gen hoặc ARN thông tin bằng cách điều chỉnh vị trí gắn kết với ribosom.

Ngoài ra, cũng có thể làm tăng hiệu quả dịch mã bằng cách điều chỉnh sử dụng codon ở gen sẽ được biểu hiện (ví dụ Najafabadi et al., Nucleic Acids Research 2009, 37 (21): 7014-7023).

Tương tự, có thể đạt được biểu hiện quá mức bằng cách làm tăng biểu hiện của protein là chất hoạt hoá hoặc làm giảm hoặc làm dập tắt biểu hiện của protein là

chất kìm hãm.

Protein là chất hoạt hoá LysG cho biểu hiện lysE đã được mô tả: Bellmann et al. (Microbiology 2001; 147: 1765-74) và trong đó đã được gọi là “gen điều hoà dương tính”. Trình tự axit amin của LysG *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 được thể hiện trong SEQ ID No. 30. Theo phép sắp hàng trình tự toàn cục, trình tự axit amin của polypeptit LysG của *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129 là 62%, trình tự axit amin của polypeptit LysG của *Corynebacterium efficiens* YS-314 là 81%, và trình tự axit amin của polypeptit LysG của *Corynebacterium glutamicum* R là 94%, đồng nhất với trình tự của SEQ ID No. 30.

Đối với các protein là chất hoạt hoá, ưu tiên dùng polypeptit mà có độ đồng nhất $\geq$ (ít nhất) 55%, tốt hơn nếu $\geq$ 80%, đặc biệt tốt hơn nếu $\geq$ 90%, $\geq$ 92% hoặc $\geq$ 94%, rất đặc biệt tốt hơn nếu $\geq$ 99%, và tốt nhất nếu 100%, so với trình tự axit amin được thể hiện trên SEQ ID No. 30.

Các biện pháp biểu hiện quá mức được đề cập, tốt hơn nếu được chọn từ nhóm bao gồm gia tăng số lượng bản sao, sử dụng vùng khởi đầu mạnh, gây đột biến vùng khởi đầu, sử dụng caxet biểu hiện thích hợp và biểu hiện quá mức protein là chất hoạt hoá, có thể được dùng phối hợp với nhau theo cách thích hợp. Do đó, có thể, ví dụ, kết hợp việc sử dụng một vùng khởi đầu thích hợp cùng với gia tăng số lượng bản sao, hoặc biểu hiện quá mức protein là chất hoạt hoá cùng với việc sử dụng vùng khởi đầu thích hợp hoặc caxet biểu hiện thích hợp.

Tương tự ngoài biện pháp liên quan đến polynucleotit mã hoá protein có hoạt tính chuyển vận L-ornithin ra ngoại bào, có thể làm suy giảm gen sinh tổng hợp đơn lẻ.

Do đó, để cải thiện sự sản xuất L-ornithin, nếu thích hợp, có thể có lợi làm suy giảm thêm một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm

- a) gen *odhA* mã hoá tiểu phần tử E1 của dehydrogenaza alpha-ketoglutarat (EC 1.2.4.2),
- b) gen *sucA* mã hoá transferaza dihydroliipoamit succinyl (EC 2.3.1.61),
- c) gen *dapA* mã hoá synthaza dihydrodipicolinat (DapA, EC 4.2.1.52),

- d) gen *dapB* mã hoá synthaza dihydrodipicolinat (DapB, EC 1.3.1.26),
- e) gen *ddh* mã hoá dehydrogenaza meso-diaminopimelat (Ddh, EC 1.4.1.16),
- f) gen *lysA* mã hoá decarboxylaza diaminopimelat (LysA, EC 4.1.1.20),
- g) gen *argR* mã hoá chất ức chế (ArgR) sinh tổng hợp L-arginin,
- h) gen *argF* mã hoá transferaza ornithin carbamoyl (ArgF, EC 2.1.3.3),
- i) gen *argG* mã hoá synthaza argininosuccinat (ArgG, EC 6.3.4.5),
- j) gen *argH* mã hoá lyaza argininosuccinat (ASAL) (ArgH, EC 4.3.2.1),
- k) gen *lysC* mã hoá kinaza aspartat (LysC, EC 2.7.2.4), và
- l) gen *asd* mã hoá dehydrogenaza aspartat semialdehyt (Asd, EC 1.2.1.11).

Ưu tiên là làm suy giảm một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *lysA*, *odhA*, *argR*, *argF*, *argG* và *argH*. Ưu tiên đặc biệt là làm suy giảm một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *lysA*, *odhA* và *argF*. Ưu tiên rất đặc biệt là làm suy giảm các gen *lysA* và/hoặc *argF*.

Thuật ngữ “làm suy giảm” trong bản mô tả này mô tả sự làm giảm hoặc tắt đi hoạt tính nội bào của một hoặc nhiều enzym (protein) ở vi khuẩn, mà được mã hoá bởi bởi ADN tương ứng, bằng cách sử dụng, ví dụ, vùng khởi đầu yếu hoặc gen hoặc alen mã hoá cho enzym tương ứng có hoạt tính thấp, hoặc bằng cách làm bất hoạt gen hoặc enzym tương ứng (protein), và tùy ý kết hợp các biện pháp này.

Có thể tham khảo tổng quan về các vùng khởi đầu đã biết có cường độ khác nhau trong *Corynebacterium glutamicum* trong tài liệu Pátek et al. (Journal of Biotechnology 104, 311-323 (2003)). Các vùng khởi đầu yếu khác được mô tả trong tài liệu trao đổi communication số 512057 trong journal Research Disclosure từ tháng 12 năm 2006 (các trang 1616 đến 1618).

Các đột biến mà có thể được xem là tạo ra sự suy giảm là đồng hoán, dị hoán, sự cài xen và khuyết đoạn của ít ra là một (1) cặp bazơ hoặc nucleotit trong vùng mã hoá của gen được đề cập. Tùy thuộc vào tác động của sự thay thế axit amin gây ra do đột biến đến hoạt tính của protein hoặc enzym, các đột biến này được gọi là đột biến sai nghĩa hoặc đột biến vô nghĩa.

Đột biến sai nghĩa gây ra sự thay thế một axit amin đưa ra trong protein bằng axit amin khác, sự thay thế nêu trên đặc biệt là thay thế axit amin không bảo toàn. Sự thay thế này làm suy giảm chức năng hoặc hoạt tính protein và giảm nó đến giá trị từ ≥ 0 đến 75%, ≥ 0 đến 50%, ≥ 0 đến 25%, ≥ 0 đến 10% hoặc ≥ 0 đến 5%.

Đột biến vô nghĩa tạo ra codon kết thúc trong vùng mã hoá của gen và do đó làm kết thúc sớm sự dịch mã và kết quả là làm mất biểu hiện gen. Sự cài xen hoặc làm khuyết đoạn của ít nhất một cặp bazơ trong gen dẫn đến đột biến xô dịch khung tạo ra sự kết hợp axit amin không đúng hoặc kết thúc sớm sự dịch mã. Nếu như quá trình đột biến tạo ra codon kết thúc trong vùng mã hoá, tương tự điều này dẫn đến sự kết thúc sớm quá trình dịch mã. Tốt hơn nếu các biện pháp tạo ra đột biến vô nghĩa được thực hiện trong phần đầu tận 5' của vùng mã hoá, mà mã hoá cho đầu tận N của polypeptit. Nếu như chiều dài tổng cộng của polypeptit (được đo bằng cách số L-axit amin liên kết hoá học) được coi là 100%, thì – trong phạm vi của sáng chế – đầu tận N của polypeptit bao gồm phần trình tự axit amin mà, theo tính toán từ axit amin khởi đầu, L-formyl-metionin, trở về trên, chứa 80% L-axit amin nằm sau.

Phương pháp gây đột biến in-vivo được mô tả, ví dụ trong Manual of Methods for General Bacteriology (Gerhard et al. (Eds.), American Society for Microbiology, Washington, DC, USA, 1981) hoặc trong Tosaka et al. (Agricultural and Biological Chemistry 42(4), 745-752 (1978)) hoặc trong Konicek et al. (Folia Microbiologica 33, 337-343 (1988)).

Các phương pháp thích hợp để gây đột biến in-vitro là, ngoài ra còn có các phương pháp khác, xử lý bằng hydroxylamin theo Miller (Miller, J.H.: A Short Course in Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and OxyRated Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1992), sử dụng oligonucleotit sinh đột biến (T.A. Brown: Gentechnologie f r Einsteiger [Genetic Engineering for Beginners], Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1993 and R.M. Horton: PCR-Mediated Recombination and Mutagenesis, Molecular Biotechnology 3, 93-99 (1995)), và sử dụng phản ứng chuỗi polymeaza bằng cách sử dụng polymeraza ADN có mức sai sót cao. Ví dụ về polymeraza ADN như vậy là polymeraza ADN Mutazyme (GeneMorph PCR Mutagenesis Kit, No. 600550) từ Stratagene (LaJolla, CA, USA).

Có thể tham khảo các chỉ dẫn và tổng quan nữa về việc tạo đột biến in vivo hoặc in vitro trong tình trạng kỹ thuật và trong các sách giáo khoa đã biết về lĩnh vực di truyền và sinh học phân tử, ví dụ như sách giáo khoa của Winnacker (“Gene and Klone”, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany, 1990) hoặc của Hagemann (“Allgemeine Genetik” [General Genetics], Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986).

Nhờ quy trình đã biết của thay thế gen hoặc alen, trong đó các nguyên tắc cơ bản được mô tả trong tài liệu: Schwarzer and Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), có thể chuyển đột biến được tạo ra in vitro, hoặc polynucleotit chứa đột biến mong muốn, vào nhiễm sắc thể. Von Schäfer et al. (Gene 145, 69-73 (1994)) đã sử dụng phương pháp này để đưa khuyết đoạn vào operon *C. glutamicum* hom-thrB. Von Nakagawa et al. (EP 1108790) và Ohnishi et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 58(2), 217-223 (2002)) đã sử dụng phương pháp này để kết hợp các đột biến khác nhau, bắt đầu từ các alen được phân lập, vào nhiễm sắc thể *C. glutamicum*.

Một phương pháp để giảm có định hướng biểu hiện của gen bao gồm việc đưa gen cần được làm suy giảm nằm dưới sự kiểm soát của vùng khởi đầu mà có thể được cảm ứng bằng cách đưa vào một lượng IPTG (isopropyl β -D-thiogalactopyranosit) được đo trước, chẳng hạn như vùng khởi đầu trc hoặc vùng khởi đầu taC. Thích hợp cho mục đích này là các vector chẳng hạn như vector biểu hiện pXK99E ở *Escherichia coli* (WO 0226787; đã được nộp lưu theo hiệp ước Budapest vào ngày 31/7/2001 trong DH5alpha/pXK99E như là DSM14440 với Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Brunswick, Germany)), pEKEx2 (số truy cập NCBI AY585307) hoặc pVWEx2 (Wendisch, Ph. D. thesis, Berichte des Forschungszentrums Jülich, Jül-3397, ISSN 0994-2952, Jülich, Germany (1997)), có thể làm cho gen đã được tách dòng này được biểu hiện trong *Corynebacterium glutamicum* theo cách phụ thuộc vào IPTG.

Phương pháp này đã được sử dụng, ví dụ trong patent WO 02266787 để cho biểu hiện được điều hoà của gen *deaD* nhờ hợp nhất vector pXK99E*deaD* vào hệ gen của *Corynebacterium glutamicum*, và nhờ phương pháp của Simic et al. (Applied and Environmental Microbiology 68: 3321-3327 (2002)) để cho biểu hiện được điều hoà của gen *glyA* bằng hợp nhất vector pK18mob*glyA*' vào *Corynebacterium glutamicum*.

Một phương pháp khác để làm giảm đặc hiệu biểu hiện của gen là kỹ thuật đối

nghĩa bao gồm việc chuyển vận vào tế bào đích các oligodeoxynucleotit ngắn hoặc vectơ để tổng hợp nên ARN đối nghĩa dài hơn. Ở đó, ARN đối nghĩa có thể gắn kết với các phần bổ trợ của ARN thông tin đặc hiệu và làm giảm độ ổn định của chúng hoặc phong bế sự dịch mã. Có thể tham khảo một ví dụ về phương pháp này được thực hiện bởi các chuyên gia trong lĩnh vực trong Srivastava et al. (Applied Environmental Microbiology 2000 Oct.; 66 (10): 4366-4371).

Mức kéo dài (chuỗi polypeptit) chịu ảnh hưởng của việc sử dụng codon. Có thể làm suy giảm biểu hiện gen bằng cách sử dụng các codon cho t-ARN là hiếm gặp chủng cha mẹ. Phương pháp này được mô tả chi tiết trong WO 2008049781 và trong WO 2009133063. Ví dụ, việc thay thế codon bắt đầu ATG bằng các codon kém thông dụng hơn là GTG hoặc TTG có thể làm suy giảm sự dịch mã, vì codon AUG là hữu hiệu gấp hai đến ba lần các codon GUG và UUG, ví dụ như (Khudyakov et al., FEBS Letters 232(2): 369-71 (1988); Reddy et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 82(17): 5656-60 (1985)).

Ngoài các biện pháp liên quan đến polynucleotit mã hoá protein có hoạt tính chuyển vận L-ornithin ra ngoài bào, tương tự có thể tăng cường các gen sinh tổng hợp gen đơn lẻ.

Do đó để cải thiện sản xuất L-ornithin, nếu thích hợp, có lợi nếu còn tăng cường hoạt tính enzym của một hoặc nhiều protein được chọn từ nhóm bao gồm

- a) dehydrogenaza glutamat (EC 1.4.1.3) được mã hoá bởi gen *gdh*,
- b) N-axetyltransferaza glutamat (EC 2.3.1.35 và EC 2.3.1.1) được mã hoá bởi gen *argJ*,
- c) axetyl glutamat kinaza (EC 2.7.2.8) được mã hoá bởi gen *argB*,
- d) Reductaza N-axetyl-gama-glutamyl-phosphat (EC 1.2.1.38) được mã hoá bởi gen *argC*,
- e) aminotransferaza axetylorithin (EC 2.6.1.11), được mã hoá bởi gen *argD*,
- f) thành phần đặc hiệu glucoza EIIB (PtsG) (EC 2.7.1.69) của hệ thống hấp thu glucoza, được mã hoá bởi gen *ptsG*,

- g) thành phần đặc hiệu sucroza EIIB (PtsS) (EC 2.7.1.69) của hệ thống hấp thu sucroza, được mã hoá bởi gen ptsS,
- h) glucoza-6-phosphat 1-dehydrogenaza (EC 1.1.1.49) được mã hoá bởi gen zwf,
- i) isomeraza glucoza-6-phosphat (EC 5.3.1.9) được mã hoá bởi gen pgi,
- j) phosphofructokinaza (EC 2.7.1.11) được mã hoá bởi gen pfkA,
- k) aldolaza fructoza-bisphosphat (EC 4.1.2.13) được mã hoá bởi gen fda,
- l) dehydrogenaza glyxeraldehyt-3-phosphat (EC 1.2.1.59) được mã hoá bởi gen gap,
- m) kinaza phosphoglyxerat (EC 2.7.2.3) được mã hoá bởi gen pgk,
- n) kinaza pyruvat (EC 2.7.1.40) được mã hoá bởi gen pyk,
- o) tiểu phần tử E1 của pyruvat dehydrogenaza (EC 1.2.4.1), được mã hoá bởi gen aceE,
- p) carboxylaza phosphoenolpyruvat (EC 4.1.1.31) được mã hoá bởi gen ppc,
- q) pyruvat carboxylaza (EC 6.4.1.1), được mã hoá bởi gen pyc,
- r) aconitaza (EC 4.2.1.3) được mã hoá bởi gen acn, và
- s) dehydrogenaza isoxitrat (EC 1.1.1.42) được mã hoá bởi gen icd.

Thuật ngữ tăng cường bao gồm các biện pháp biểu hiện quá mức và sử dụng các biến thể có hoạt tính xúc tác tăng lên so với protein của kiểu đại.

Ưu tiên đặc biệt là tăng cường một hoặc nhiều enzym được chọn từ nhóm bao gồm dehydrogenaza glutamat, N-axetyltransferaza glutamat và axetylglutamat kinaza.

Các biện pháp bổ sung để làm suy giảm đã được liệt kê có thể được dùng phối hợp với các biện pháp tăng cường bổ sung.

Có thể tham khảo các chỉ dẫn cho việc xử lý ADN, phân cắt và ghép nối ADN, biến nạp và chọn lọc các thể biến nạp, ngoài ra còn các tài liệu khác, trong sổ tay đã biết của Sambrook et al. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

Có thể xác định mức độ biểu hiện hoặc biểu hiện quá mức bằng cách đo lường lượng hoặc nồng độ ARN thông tin được phiên mã từ gen, bằng cách xác định lượng hoặc nồng độ của polypeptit và bằng cách xác định mức enzym hoạt tính.

Có thể xác định lượng ARN thông tin, ngoài ra còn có các phương pháp khác, bằng cách sử dụng “phương pháp thẩm tách Bắc” và RT-PCR định lượng. Trong phương pháp RT-PCR định lượng, có quá trình phiên mã ngược dòng diễn ra trước phản ứng chuỗi polymeaza. Nhằm mục đích này có thể sử dụng hệ thống LightCycler™ của Roche Diagnostics (Boehringer Mannheim GmbH, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany), như mô tả ví dụ trong Jungwirth et al. (FEMS Microbiology Letters 281, 190-197 (2008)). Có thể xác định nồng độ protein bằng cách chiết tách gel protein 1 và 2 chiều và sau đó nhận diện bằng phương pháp quang học nồng độ protein trong gel bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá thích hợp. Phương pháp chung điều chế gel protein cho vi khuẩn *Coryneform* và nhận diện protein là quy trình được mô tả bởi Hermann et al. (Electrophoresis, 22: 1712-23 (2001)). Tương tự, nồng độ protein có thể được xác định bằng phương pháp lai thẩm tách Tây bằng cách sử dụng kháng thể đặc hiệu cho protein cần được phát hiện (Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) và sau đó đánh giá bằng phương pháp quang học bằng cách sử dụng phần mềm xác định nồng độ thích hợp (Lohaus and Meyer (1998) Biospektrum 5: 32-39; Lottspeich, Angewandte Chemie 321: 2630-2647 (1999)).

Nhằm mục đích sản xuất L-ornithin, vi khuẩn tạo ra có thể được nuôi cấy liên tục – như mô tả, ví dụ, trong WO 05/021772 – hoặc gián đoạn theo quy trình gián đoạn (nuôi cấy gián đoạn) hoặc quy trình gián đoạn bổ sung chất dinh dưỡng hoặc quy trình gián đoạn bổ sung chất dinh dưỡng lặp lại (như được mô tả trong US 6,562,601 chẳng hạn). Tóm tắt về bản chất chung của các phương pháp nuôi cấy đã biết được nêu trong sách giáo khoa của Chmiel (Bioprozesstechnik [Bioprocess Technology] 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik [Introduction to Bioprocess Engineering] (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)), hoặc trong sách giáo khoa của Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen [Bioreactors and Peripheral Equipment] (Vieweg Verlag, Brunswick/Wiesbaden, Germany 1994)).

Môi trường nuôi cấy hoặc môi trường lên men để sử dụng phải thỏa mãn một cách phù hợp nhu cầu của chủng cụ thể. “Manual of Methods for General Bacteriology” của American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) có mô tả môi trường nuôi cấy cho các vi sinh vật khác nhau. Các thuật ngữ môi trường sinh trưởng, môi trường nuôi cấy và môi trường lên men hoặc môi trường được dùng thay cho nhau.

Có thể sử dụng, như là cacbon nguồn, các đường và hydrat cacbon chẳng hạn như glucoza, sucroza, lactoza, fructoza, maltoza, mật đường, các dung dịch chứa sucroza từ cây củ cải đường hoặc quá trình xử lý đường mía, tinh bột, dịch thủy phân tinh bột và xenluloza, các dầu và các chất béo chẳng hạn như dầu đậu tương, dầu hướng dương, dầu lạc và chất béo dừa, các axit béo chẳng hạn như axit palmitic, axit stearic và axit linoleic, các rượu chẳng hạn như glyxerol, metanol và etanol, và các axit hữu cơ chẳng hạn như axit axetic hoặc axit lactic.

Với đường, ưu tiên dùng glucoza, fructoza, sucroza, các hỗn hợp của glucoza và fructoza, và các hỗn hợp của glucoza, fructoza và sucroza. Nếu thích hợp, ưu tiên đặc biệt dùng sucroza.

Với rượu, ưu tiên dùng glyxerol.

Có thể sử dụng, làm nguồn nitơ, các hợp chất hữu cơ chứa nitơ chẳng hạn như pepton, dịch chiết nấm men, dịch chiết, dịch chiết malt, dịch ngâm ngô, bột đậu nành và ure, hoặc các hợp chất vô cơ chẳng hạn như amoni sulphat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni cacbonat và amoni nitrat. Nguồn nitơ có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc dưới dạng hỗn hợp.

Có thể sử dụng axit phosphoric, kali dihydro phosphat hoặc đikali hydro phosphat hoặc các muối chứa natri tương ứng làm nguồn phospho.

Ngoài ra, môi trường nuôi cấy phải chứa các muối, ví dụ ở dạng clorua hoặc sulphat của các kim loại chẳng hạn như natri, kali, magie, canxi và sắt, ví dụ chẳng hạn như magie sulphat hoặc sắt sulphat, là các chất cần thiết cho sự phát triển. Cuối cùng, Ngoài các chất nêu trên có thể sử dụng các chất thiết yếu cho sự phát triển chẳng hạn như axit amin, ví dụ như homoserin và các vitamin, ví dụ như thiamin, biotin hoặc axit pantothenic.

Các nguyên liệu được đề cập trên đây có thể được cho vào môi trường nuôi cấy thành một mẻ hoặc được cấp theo cách thích hợp trong quá trình nuôi cấy.

Có thể không chế độ pH của môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng các hợp chất kiềm chẳng hạn như natri hydroxit, kali hydroxit, amoniac hoặc amoniac trong nước, hoặc các hợp chất axit chẳng hạn như axit phosphoric hoặc axit sulfuric theo cách thích hợp. Độ pH thường được điều chỉnh đến giá trị nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,5, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8. Để không chế quá trình tạo bọt, có thể sử dụng các chất chống tạo bọt chẳng hạn như este polyglycol của axit béo. Để duy trì độ ổn định của plasmit, có thể cho vào môi trường các chất chọn lọc thích hợp chẳng hạn như chất kháng sinh. Tốt hơn nếu quá trình lên men được thực hiện trong điều kiện ưa khí. Để duy trì các điều kiện này, đưa oxy hoặc hỗn hợp khí chứa oxy chẳng hạn như không khí vào trong môi trường nuôi cấy. Tương tự, có thể sử dụng các chất lỏng được làm giàu hydro peroxit. Nếu thích hợp, quá trình lên men được thực hiện ở áp suất nâng cao, ví dụ như ở áp suất nâng cao nằm trong khoảng từ 0,03 đến 0,2 MPa. Nhiệt độ của môi trường nuôi cấy thường nằm trong khoảng từ 20°C đến 45°C và tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 25°C đến 40°C, đặc biệt tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 30°C đến 37°C. Trong các quy trình gián đoạn, ưu tiên tiếp tục nuôi cấy cho đến khi tạo ra một lượng L-ornithin mong muốn đủ để thu hồi. Mục đích này thường đạt được trong thời gian từ 10 giờ đến 160 giờ. Với quy trình liên tục, có thể thực hiện thời gian nuôi cấy lâu hơn. Hoạt tính của vi khuẩn tạo ra nồng độ hoặc sự tăng nồng độ (tích lũy) L-ornithin trong môi trường lên men.

Có thể tham khảo ví dụ môi trường lên men thích hợp, ngoài ra là các tài liệu khác, trong các patent JP 43010996 B4 (cho *B. subtilis*), US 3668072 A (cho *E. coli*) và JP 57041912 B (cho *B. flavum*).

Nếu thích hợp, thể tích của môi trường lên men trong quy trình theo sáng chế là = 0,5 l, = 1 l, = 5 l, = 10 l, = 50 l, = 100 l, = 500 l, = 1000 l, tốt hơn nếu = 1 l, đặc biệt tốt hơn nếu = 10 l, rất đặc biệt tốt hơn nếu = 100 l và tốt nhất nếu = 1000 l.

Để xác định nồng độ ở một hoặc nhiều thời điểm trong tiến trình lên men, có thể phân tích L-ornithin bằng cách tách L-axit amin bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion, tốt hơn nếu phương pháp sắc ký trao đổi cation, với quá trình tạo dẫn xuất sau cột sau đó bằng cách sử dụng ninhydrin, như mô tả trong Spackman et al. (Analytical

Chemistry 30: 1190-1206 (1958)). Ngoài ra, cũng có thể sử dụng ortho-phthalđialđehyt tốt hơn là ninhyđrin cho quá trình tạo dẫn xuất sau cột. Có thể tham khảo bài báo tổng quan về phương pháp sắc ký trao đổi ion trong Pickering (LC.GC (Magazine of Chromatographic Science) 7(6), 484-487 (1989)).

Tương tự, có thể thực hiện quá trình tạo dẫn xuất trước cột, ví dụ như bằng cách sử dụng ortho-phthalđialđehyt hoặc phenyl isothioxyanat, và để tách phân đoạn các dẫn xuất axit amin thu được bằng phương pháp sắc ký đảo pha (RP), tốt hơn nếu ở dạng phương pháp sắc ký lỏng tính năng cao (HPLC). Phương pháp thuộc dạng này được mô tả, ví dụ trong Lindroth et al. (Analytical Chemistry 51: 1167-1174 (1979)). Việc phát hiện được thực hiện bằng phương pháp đo quang (hấp thụ, huỳnh quang).

Có thể tham khảo bàn luận về phân tích axit amin, ngoài ra là các tài liệu khác, trong sách giáo khoa "Bioanalytik" của Lottspeich và Zorbas (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Germany 1998).

Đặc tính của các quy trình hoặc các quy trình lên men theo sáng chế, xét về một hoặc nhiều các thông số được chọn từ nhóm bao gồm nồng độ L-ornithin (L-ornithin được tạo ra trên một đơn vị thể tích), hiệu suất thu L-ornithin (L-ornithin được tạo ra trên nguồn cacbon tiêu thụ), sự tạo thành L-ornithin (L-ornithin được tạo ra trên thể tích và thời gian), và sự tạo thành L-ornithin đặc trưng (L-ornithin được tạo ra trên chất khô tế bào hoặc sinh khối khô và thời gian, hoặc L-ornithin được tạo ra trên protein tế bào và thời gian), hoặc các thông số quy trình khác nữa và kết hợp của các thông số này, được tăng lên đến mức ít nhất 0,5%, ít nhất 1%, ít nhất 1,5% hoặc ít nhất 2%, so với các quy trình hoặc các quy trình lên men sử dụng vi khuẩn chứa protein có hoạt tính chuyển vận L-ornithin ra ngoài bào không biểu hiện quá mức hoặc vi khuẩn chưa được xử lý bằng biện pháp biểu hiện quá mức.

Các biện pháp lên men này tạo ra môi trường lên men lỏng chứa L-ornithin mong muốn.

Sau đó, sản phẩm chứa L-ornithin được sinh ra hoặc tạo ra hoặc thu hồi ở dạng lỏng hoặc rắn.

Môi trường lên men lỏng dùng để chỉ môi trường lên men hoặc môi trường sinh trưởng trong đó đã nuôi cấy vi sinh vật trong một thời gian nào đó và ở nhiệt độ

nào đó. Môi trường lên men hoặc môi trường được sử dụng trong quá trình lên men chứa tất cả các chất hoặc hợp phần đảm bảo quá trình sản xuất L-ornithin nêu trên và sự nhân lên và khả năng sống thông thường.

Khi quá trình lên men diễn ra hoàn toàn, thu được môi trường lên men lỏng theo đó chứa

- a) sinh khối vi khuẩn (khối tế bào) tạo ra do sự nhân lên các tế bào vi khuẩn,
- b) L-ornithin được tạo ra trong quá trình lên men,
- c) các sản phẩm phụ hữu cơ được tạo ra trong quá trình lên men, và
- d) các chất cấu thành của môi trường lên men được sử dụng hoặc của nguyên liệu, ví dụ các vitamin chẳng hạn như biotin hoặc các muối chẳng hạn như magie sulphat, mà chưa được tiêu thụ trong quá trình lên men.

Các sản phẩm phụ hữu cơ bao gồm các chất được tạo ra bởi vi khuẩn được sử dụng trong quá trình lên men không phải là L-ornithin và tùy ý được tiết ra ngoại bào. Các chất này còn bao gồm các đường chẳng hạn như trehaloza.

Môi trường lên men lỏng được lấy ra từ thùng nuôi cấy hoặc thùng lên men, tùy ý được gom, và được sử dụng để tạo ra sản phẩm chứa L-ornithin ở dạng lỏng hoặc rắn. Thuật ngữ “thu hồi sản phẩm chứa L-ornithin” cũng được sử dụng cho nghĩa này. Trong trường hợp đơn giản nhất, chính môi trường lên men lỏng chứa L-ornithin, mà đã được lấy ra khỏi thùng lên men, cấu thành nên sản phẩm thu hồi.

Một hoặc nhiều biện pháp được chọn từ nhóm bao gồm

- a) loại bỏ một phần ($> 0\%$ đến $< 80\%$) đến hoàn toàn (100%) hoặc hầu như hoàn toàn ($\geq 80\%$, $\geq 90\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$ hoặc $\geq 99\%$ đến $< 100\%$) nước,
- b) loại bỏ sinh khối một phần ($> 0\%$ đến $< 80\%$) đến hoàn toàn (100%) hoặc hầu như hoàn toàn ($\geq 80\%$, $\geq 90\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$ hoặc $\geq 99\%$ đến $< 100\%$), sinh khối này tùy ý được làm bất hoạt trước khi loại bỏ,
- c) loại bỏ các sản phẩm phụ hữu cơ được tạo ra trong quá trình lên men một phần ($> 0\%$ đến $< 80\%$) đến hoàn toàn (100%) hoặc hầu như hoàn toàn ($\geq 80\%$,

$\geq 90\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$, $\geq 99\%$, $\geq 99,3\%$ hoặc $\geq 99,7\%$ đến $< 100\%$), và

d) loại bỏ các chất cấu thành môi trường lên men được sử dụng hoặc các nguyên liệu, mà chưa được tiêu thụ trong quá trình lên men một phần ($> 0\%$) đến hoàn toàn (100%) hoặc hầu như hoàn toàn ($\geq 80\%$, $\geq 90\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$, $\geq 99\%$, $\geq 99,3\%$ hoặc $\geq 99,7\%$ đến $< 100\%$),

ra khỏi môi trường lên men lỏng để đạt được nồng độ hoặc tinh chế L-ornithin. Các sản phẩm có nồng độ L-ornithin mong muốn được phân lập theo cách này.

Quá trình loại bỏ nước một phần ($> 0\%$ đến $< 80\%$) đến hoàn toàn (100%) hoặc hầu như hoàn toàn ($\geq 80\%$ đến $< 100\%$) (biện pháp a)) còn được gọi là làm khô.

Theo một biến thể của quy trình này, sự loại bỏ nước, sinh khối, các sản phẩm phụ hữu cơ và các chất cấu thành môi trường lên men chưa được tiêu thụ hoàn toàn hoặc hầu như hoàn toàn tạo ra dạng sản phẩm L-ornithin tinh khiết ($\geq 80\%$ theo trọng lượng hoặc $\geq 90\%$ theo trọng lượng) hoặc có độ tinh khiết cao ($\geq 95\%$ theo trọng lượng, $\geq 97\%$ theo trọng lượng hoặc $\geq 99\%$ theo trọng lượng). Nhiều chỉ dẫn kỹ thuật cho các biện pháp theo a), b), c) hoặc d) là đã biết trong tình trạng kỹ thuật.

Trong trường hợp với axit amin L-ornithin hoặc các muối của nó, về cơ bản có ba sản phẩm khác nhau đã được mô tả trong tình trạng kỹ thuật.

Một nhóm sản phẩm tạo ra L-ornithin HCL, mà từ đó L-ornithin được tinh chế khỏi dung dịch lên men, sau loại bỏ tế bào nhờ chất trao đổi ion, và sau đó được kết tinh nhờ quá trình kết tinh dưới dạng L-ornithin monoclorua và kết tinh lại như là L-ornithin monoclorua (US 2988489). L-ornithin HCL thu được trong trường hợp này có độ tinh khiết cao hơn $> 90\%$, tốt hơn nếu cao hơn 95% , đặc biệt tốt hơn nếu cao hơn 98% , và rất đặc biệt tốt hơn nếu cao hơn 99% .

Một quy trình nữa được mô tả trong đơn patent EP 1995322. Quy trình này bao gồm việc đưa dung dịch lên men chứa sinh khối lên phía trên chất trao đổi ion có tính axit yếu với đường kính hạt $> 300 \mu\text{m}$ và tinh chế L-ornithin bằng bước này. Việc lựa chọn đường kính hạt thích hợp ngăn cho sinh khối không bao vây nhựa. Hiệu quả của quá trình loại tế bào là 99% .

Sau đó, L-ornithin được tinh chế này có thể được sử dụng để điều chế các muối L-ornithin khác nhau chẳng hạn như mono- hoặc di-L-ornithin α -ketoglutarat, L-ornithin L-aspartat, v.v.

EP 0477 991, ví dụ, đề xuất quy trình điều chế L-ornithin L-aspartat. Quy trình này bao gồm bước bổ sung dung môi tan được trong nước vào dung dịch nước của L-ornithin và L-aspartat để thu được dung dịch mà ít nhất 90% bão hoà hoặc quá bão hoà. Dung dịch nêu trên được gia nhiệt ở điều kiện hồi lưu cho đến khi kết thúc tạo thành tinh thể. Sau đó, dung môi có thể trộn lẫn với nước này được tiếp tục bổ sung ở điều kiện hồi lưu cho đến khi tạo ra tinh thể muối. Các tinh thể này có thể được loại ra, ví dụ, bằng cách ly tâm và sau đó được sấy khô trong chân không. Độ tinh khiết của sản phẩm thông thường là cao hơn 98,5%.

JP 46003194 mô tả quy trình điều chế L-ornithin L-ketoglutarat. Quy trình này bao gồm, ví dụ, việc chuyển hoá ornithin HCL thành dạng bazơ tự do bằng cách hấp phụ lên chất trao đổi ion có tính axit và giải hấp bằng amoniac trong nước, bổ sung α -ketoglutarat và làm bay hơi dung dịch này trong chân không cho đến khi sản phẩm kết tinh.

Plasmid pEC7lysE đã được nộp lưu ở dạng chủng *Escherichia coli* DH5alpha/pEC7lysE (DM2204) theo hiệp ước Budapest tại Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Brunswick, Germany) với số truy cập DSM 23239 vào ngày 15/01/2010.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1:

Tách dòng và xác định trình tự gen lysE từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

Gen lysE của chủng ATCC13032 được tách dòng vào vector con thoi và vector biểu hiện pVWEx1 của *E. coli/C. glutamicum* (Peters-Wendisch et al., J. Mol. Microbiol. Biotechnol. (2001) 3(2): 295-300).

Quá trình tách dòng được thực hiện theo hai bước. Trước hết, phản ứng chuỗi polymeaza (PCR) khuếch đại gen từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 nhờ các đoạn mồi oligonucleotit sau đây thu được từ SEQ ID No. 1. Các oligonucleotit nêu

trên bao gồm vị trí phân cắt hạn chế bổ sung ở đầu 5' của chúng (phần được gạch chân: EcoRV cho lysE_1.p và AvrII hoặc SspI cho lysE_2.p).

lysE_1.p: 5'-[TCGATATCATGGAAATCTTCATTACAGG]-3'
(xem SEQ ID No. 22)

lysE_2.p: 5'-[TGCCTAGGTCAATATTTGGGCGAAGGCCACCG]-3'
(xem SEQ ID No. 23)

Phản ứng PCR này được thực hiện với sự có mặt của 200 μ M deoxynucleosit triphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,5 μ M mỗi trong số oligonucleotit tương ứng, 100 ng ADN nhiễm sắc thể *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, 1/5 thể tích trong 5 lần dung dịch đệm phản ứng HF và 0,02 U/ μ l polymeraza ADN Phusion® Hot Start (Biozym Scientific GmbH, D-31840 Hess. Oldendorf) trong máy chu trình nhiệt (Mastecycler, Eppendorf AG, Hamburg) trong điều kiện sau đây: 98°C trong thời gian 1 phút; 30 chu trình $\times$ (98°C, 20 giây; 63°C, 20 giây; 72°C, 40 giây); 72°C trong thời gian 6 phút.

Mảnh lysE PCR 761 cặp bazơ (xem SEQ ID No. 3) được tách dòng vào pVWEx1 như mô tả sau đây:

Điều chế vector: 1 μ g ADN plasmit pVWEx1 được phân cắt trong hệ dung dịch đệm đặc hiệu enzym chứa 10 đơn vị enzym PstI bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 1 h. Ngay sau đó, hỗn hợp phân cắt này được xử lý bằng Quick Blunting Kit (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất và sau đó được tinh chế bằng cách sử dụng kit tinh chế QiaExII (Qiagen AG, Hilden, Germany) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Sau đó, vector đã được xử lý trước bằng cách này được phân cắt bằng 10 đơn vị XbaI trong hệ dung dịch đệm đặc hiệu enzym ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 1 h và sau đó được tinh chế tiếp bằng cách sử dụng kit tinh chế QiaExII.

Điều chế đoạn cài xen: mảnh PCR lysE được phân cắt bằng 10 đơn vị mỗi trong số các enzym AvrII và EcoRV và sau đó được tinh chế bằng cách sử dụng kit tinh chế QiaExII theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Ghép nối: các vector và cài xen được trộn ở tỷ số mol 1:5 và được ghép nối bằng cách sử dụng ligaza ADN T4 ở nhiệt độ 16°C trong thời gian 1 h. Các tế bào

E. coli DH5alpha khả biến hóa học (Subcloning efficiency, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany) được biến nạp bằng 3 µl hỗn hợp ghép nối.

Các thể biến nạp được nhận diện dựa trên tính kháng kanamycin của chúng trên các đĩa LB-thạch chứa 50 µg/ml kanamycin sulphat. ADN plasmid được phân lập từ 4 trong số các thể biến nạp nêu trên, và các plasmid này được thử nghiệm bằng phân tích hạn chế về sự có mặt của mảnh 0,75 kb như là đoạn cài xen. Plasmid tái tổ hợp này được tạo ra bằng cách này được gọi là pVWEx1_lysE.

Trình tự nucleotit của mảnh 0,75 kb này trong plasmid pVWEx1-lysE được xác định bằng phương pháp kết thúc mạch deoxy theo Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1977) 74: 5463-5467). Với mục đích này, đoạn cài xen hoàn toàn của plasmid pVWEx1_lysE được xác định trình tự nhờ các đoạn mồi oligonucleotit pVW_1.p (5'-TGA GCG GAT AAC AAT TTC ACA C-3') và pVW_2.p (5'-CGA CGG CCA GTG AAT TCG AG-3') ở Eurofins MWG Operon GmbH (Ebersberg, Germany).

Phân tích trình tự nucleotit thu được bằng cách sử dụng chương trình Clone Manager 9 Program và được thể hiện trên SEQ ID No. 20.

Ví dụ 2:

Cấu trúc của vector pK18mobsacB_DargFRGH cho sự khuyết đoạn vùng argFRGH trong *Corynebacterium glutamicum*

Nhằm mục đích này, trước hết ADN nhiễm sắc thể được phân lập từ *C. glutamicum* ATCC13032 bằng phương pháp của Tauch et al. (1995, Plasmid 33: 168-179). Chọn lọc các oligonucleotit được liệt kê sau đây dựa trên trình tự của gen argFRGH *C. glutamicum* để điều chế cấu trúc khuyết đoạn argFRGH. Cấu trúc khuyết đoạn nêu trên được tạo ra nhờ phản ứng chuỗi polymeaza (PCR), cụ thể hơn là bằng phương pháp SOEing gen (Gene Splicing by Overlap Extension, Horton, Molecular Biotechnology 3: 93-98 (1995)).

argFRGH_d1:

5'-GGT GGT GCT AGC CCG GCG ATT TCT TTG CAC AT-3'
(xem SEQ ID No. 24)

argFRGH_d2:

5'-AAT GCT TAT CGA CGT ACC CCC CTG TGG TTG TGA AGT Mèo A-3'
(xem SEQ ID No. 25)

argFRGH_d3:

5'-GGG GTA CGT CGA TAA GCA TT-3'
(xem SEQ ID No. 26)

argFRGH_d4:

5'-GGT GGT ATG CAT GGT GAT GGT TCC GAA TGT TG-3'
(xem SEQ ID No. 27)

Các đoạn môi oligonucleotit được chỉ ra được mua của Eurofins MWG Operon GmbH (Ebersberg, Germany). Phản ứng PCR này được thực hiện bằng cách sử dụng polymeraza ADN Phusion® Hot Start (Biozym Scientific GmbH, D-31840 Hess, Oldendorf) trong máy chu trình nhiệt (Mastercycler, Eppendorf AG, Hamburg).

Đoạn môi argFRGH_d2 bao gồm hai vùng. Một phần của trình tự nucleotit này là bổ trợ với vùng từ 1 cặp bazơ ở phía trước đến 19 cặp bazơ nằm sau codon bắt đầu của gen argF. Phần kia của trình tự nucleotit là bổ trợ với vùng từ nucleotit 1419 của gen argH đến 5 nucleotit nằm sau gen argH.

Bằng phản ứng chuỗi polymeaza, các đoạn môi argFRGH_1 và argFRGH_2 giúp mảnh ADN 543 cặp bazơ và các đoạn môi argFRGH_3 và argFRGH_4 giúp mảnh ADN 513 cặp bazơ được khuếch đại. Các đơn vị siêu sao chép được tạo ra bằng PCR, được đánh giá bằng cách điện di trên gel agarosa cường độ 0,8%, được phân lập từ gel agarosa nêu trên bằng cách sử dụng kit tinh chế sản phẩm High Pure PCR Product Purification Kit (sản phẩm số 1732676, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), và được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR khác nữa bằng cách sử dụng các đoạn môi argFRGH_1 và argFRGH_4. Theo cách này, tạo ra dẫn xuất khuyết DargFRGH gồm 1036 cặp bazơ (xem SEQ ID No. 21). Dộn xuất bao gồm 477 cặp bazơ của đầu 3' của gen argD, 19 cặp bazơ của đầu 5' của gen argF, 15 cặp bazơ của đầu 3' của gen argH, và 420 cặp bazơ của đầu 5' của khung đọc cg1589. Sản phẩm được khuếch đại bằng cách này được thử nghiệm bằng điện di trong gel agarosa cường độ 0,8%.

Sản phẩm PCR DargFRGH 1,04 kb (SEQ ID No. 21) được phân cắt hoàn toàn

bằng các enzym NdeI và NsiI. Sau đó, mảnh này được tinh chế bằng cách sử dụng kit tinh chế PCR (Qiagen, Hilden, Germany). Dẫn xuất khuyết đoạn DargFRGH đã được xử lý trước bằng cách này được sử dụng cùng với vector tách dòng có tính bất định pK18mobsacB (Schäfer et al. (1994), Gene 14: 69-73) để ghép nối. Vector tách dòng nêu trên trước đây đã được phân cắt hoàn toàn bằng endonucleaza giới hạn XbaI và PstI. Quá trình này tạo ra đầu tận ADN tương thích đầu tận của các đoạn cài xen tạo ra do sự phân cắt NdeI và NsiI. Vector được điều chế bằng cách này được trộn với mảnh DargFRGH ở tỷ số mol 1:5 và được ghép nối bằng cách sử dụng ligaza ADN T4 (Amersham- Pharmacia, Freiburg, Germany) ở nhiệt độ 16°C trong thời gian 1 giờ. Các tế bào *E. coli* DH5alpha khả biến hóa học (Subcloning efficiency, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany) được biến nạp bằng 3 µl hỗn hợp ghép nối. Các thể biến nạp được nhận diện dựa trên tính kháng kanamycin của chúng trên các đĩa LB-thạch chứa 50 µg/ml kanamycin sulphat. ADN plasmit được phân lập từ 4 trong số các thể biến nạp nêu trên (QIAprep Spin Miniprep Kit từ Qiagen (Hilden)), và các plasmit này được thử nghiệm bằng phân tích hạn chế về sự có mặt mảnh 1,04 kb như là đoạn cài xen. Plasmit tái tổ hợp này tạo ra bằng cách này được gọi là pK18mobsacB_DargFRGH. Chúng này được gọi là *E.coli*_DH5alpha/pK18mobsacB_DargFRGH.

Trình tự nucleotit của mảnh 1,04 kb (SEQ ID No. 21) trong plasmit pK18mobsacB_DargFRGH được xác định bằng phương pháp kết thúc mạch deoxy theo Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1977) 74: 5463-5467). Với mục đích này, cài xen hoàn toàn của plasmit pK18mobsacB_DargFRGH được xác định trình tự và do đó được thử nghiệm về sự ghép chính xác nhờ các đoạn mồi oligonucleotit M13 uni (-21) (5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3') và M13 rev (-49) (5'-GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG-3') ở Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany).

Ví dụ 3:

Tạo ra chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032_DargFRGH

Vector được đề cập ở Ví dụ 2, pK18mobsacB_DargFRGH, được chuyển bằng tiếp hợp theo phương pháp của Schäfer et al. (Journal of Microbiology 172: 1663-1666 (1990)) vào chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032. Nhằm mục đích

này, vector này đã được biến nạp trước vào chủng *E. coli* S17-1 (Simon et al., Biotechnology 1: 784-791). Vector trong S17-1 được thử nghiệm về sự tương tự đồng nhất để phát hiện trong *E. coli* DH5alpha (xem Ví dụ 2).

Các vector pK18mobsacB và pK18mobsacB_DargFRGH không thể tự sao chép trong *C. glutamicum* ATCC13032 và được giữ trong tế bào chỉ nếu như chúng đã được hợp nhất vào nhiễm sắc thể sau khi tiến hành tái tổ hợp. Các dòng có pK18mobsacB_DargFRGH được hợp nhất được lựa chọn bằng cách cấy dần trải hỗn hợp tiếp hợp trên thạch LB (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, New York, 1989) được bổ sung 15 mg/l kanamycin và 50 mg/ml axit nalidixic. Các dòng được thiết lập được đưa vào các đĩa thạch LB chứa 25 mg/l kanamycin và được ủ ở nhiệt độ 33°C trong thời gian 16 giờ. Các thể đột biến trong đó plasmit đã bị cắt đi do hiện tượng tái tổ hợp thứ hai được lựa chọn bằng cách nuôi cấy các dòng này trong môi trường lỏng LB mà không có chọn lọc trong thời gian 20 giờ, sau đó đưa chúng lên thạch LB chứa 10% sucroza, tiếp theo là ủ trong thời gian 24 giờ.

Plasmit pK18mobsacB_DargFRGH, giống như plasmit ban đầu pK18mobsacB, chứa ngoài gen có tính kháng kanamycin, bản sao của gen sacB mã hoá levansucraza của *Bacillus subtilis*. Biểu hiện chịu cảm ứng bởi sucroza này dẫn tới sự tạo thành levansucraza là chất làm xúc tác quá trình tổng hợp sản phẩm levan là sản phẩm gây độc cho *C. glutamicum*. Kết quả là, chỉ có các dòng trong đó pK18mobsacB_DargFRGH được hợp nhất đã bị cắt đi là có sự phát triển trên thạch LB chứa sucroza. Phần cắt này có thể là phần cắt của plasmit cùng với hoặc là bản sao trên nhiễm sắc thể đầy đủ của argFRGH hoặc bản sao không đầy đủ có khuyết đoạn argFRGH nội tại.

Khoảng từ 40 đến 50 khuẩn lạc được thử nghiệm về kiểu hình “phát triển với sự có mặt của sucroza” và “không phát triển với sự có mặt của kanamycin”. Để chứng tỏ rằng alen argFRGH được làm khuyết vẫn còn trong nhiễm sắc thể, vào khoảng 20 khuẩn lạc có kiểu hình “phát triển với sự có mặt của sucroza” và “không phát triển với sự có mặt của kanamycin” được nghiên cứu bằng phương pháp PCR chuẩn của Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, 1990, Academic Press) nhờ phản ứng chuỗi polymeaza. Quá trình này bao gồm việc khuếch đại từ ADN

nhiễm sắc thể của khuẩn lạc mảnh ADN mang vùng bao quanh vùng argFRGH được làm khuyết. Các đoạn mồi oligonucleotit sau đây được chọn lọc cho PCR.

argFRGH_d1 (SEQ ID No. 24):

5'-GGT GGT GCT AGC CCG GCG ATT TCT TTG CAC AT-3'

argFRGH_d4 (SEQ ID No. 27):

5'-GGT GGT ATG CAT GGT GAT GGT TCC GAA TGT TG-3'

Để khống chế các dòng chứa locut argFRGH đầy đủ, các đoạn mồi có khả năng khuếch đại mảnh ADN vào khoảng 5,35 k B . Trong các dòng có locut argFRGH được làm khuyết, các mảnh ADN có kích cỡ vào khoảng 1,04 kb được khuếch đại.

Các mảnh ADN được khuếch đại được nhận diện bằng điện di trong gel agarosa cường độ 0,8%. Bằng phép nhận diện này, chủng này được chỉ ra là mang alen argFRGH được làm khuyết trên nhiễm sắc thể. Chủng này được gọi là *Corynebacterium glutamicum* Delta_argFRGH.

Ví dụ 4:

Biểu hiện của gen lysE trong *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032_Delta_argFRGH

Plasmid pVWEx1_LysE và plasmid trống pVWEx1 được đưa vào chủng tạo L-ornithin ATCC 13032_Delta_argFRGH bằng phương pháp đục lỗ điện (Haynes et al., FEMS Microbiology Letters (1989) 61: 329-334). Các thể biến nạp được nhận diện dựa trên tính kháng kanamycin của chúng trên các đĩa thạch Caso chứa 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamycin. Sau đó, 5 dòng đơn được kiểm tra về sự chuẩn xác của plasmid được biến nạp. Nhằm mục đích này, ADN plasmid được phân lập (Plasmid Isolation Kit, Qiagen), và ADN này được đánh giá bằng phân tích hạn chế về kiểu phân cắt đúng. Bằng cách này, tạo ra chủng *C. glutamicum* ATCC 13032_Delta_argFRGH/pVWEx1_lysE và ATCC 13032_Delta_argFRGH/pVWEx1.

Ví dụ 5:

Điều chế L-ornithin bằng cách sử dụng *Corynebacterium glutamicum*

Để nghiên cứu khả năng của các chủng tạo ra L-ornithin, trong mỗi trường hợp ba dòng của chủng ATCC 13032_Delta_argFRGH/pVWEx1_lysE và ba dòng của

chủng ATCC 13032_Delta_argFRGH/pVWEx1 được nuôi cấy sơ bộ trong môi trường hợp trong 10 ml môi trường thử nghiệm ở nhiệt độ 33°C trong thời gian 16 giờ. Để dùng cho thử nghiệm sản xuất, trong mỗi trường hợp 10 ml môi trường thử nghiệm được cấy nuôi cấy sơ bộ thu được sao cho OD₆₀₀ (mật độ quang học ở 600 nm) ở ban đầu là 0,1. Mỗi dòng được thử nghiệm trong ba bình lắc sao cho mỗi chủng ở mỗi thời điểm thu hoạch tương ứng được thể hiện tổng số bằng chín bình lắc. Môi trường thử nghiệm là đồng nhất với môi trường CgXII như được mô tả trong Keilhauer et al. (Journal of Bacteriology (1993) 175: 5593-5603) nhưng ngoài ra chứa 7,5 g/l dịch chiết nấm men (Difco), 25 µg/ml kanamycin, 1 mM IPTG (isopropyl beta-D-thiogalactopyranosit) và 40 g/l sucroza thay cho glucoza. Để đơn giản, thành phần của môi trường thử nghiệm được tổng kết trong Bảng 2 sau đây.

Bảng 2

Hợp phần	Lượng cho 1 l
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g
Ure	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,25 g
Axit 3-morpholinopropansulphonic (MOPS)	42 g
CaCl ₂	0,01 g
FeSO ₄ × 7H ₂ O	0,01 g
MnSO ₄ × H ₂ O	0,01 g
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	0,001 g
CuSO ₄	0,0002 g
NiCl ₂ × 6H ₂ O	0,00002 g
Biotin	0,0002 g
Axit protocatechuic	0,03 g
Sucroza	40 g
Dịch chiết nấm men	7,5 g
pH (có NaOH)	7

Việc nuôi cấy được thực hiện trong bình lắc 100 ml ở nhiệt độ 33°C và 200 vòng/phút. Độ vồng của bình lắc là 5 cm. Ba nuôi cấy của một dòng được thu hoạch sau 24 và 48 giờ. Nhằm mục đích này, lấy mẫu ra khỏi môi trường nuôi cấy và xác định mật độ quang, hàm lượng sucroza và hàm lượng L-ornithin. Để xác định hàm lượng sucroza và hàm lượng L-ornithin, các tế bào được loại ra bằng cách ly tâm nhanh (ly tâm đỉnh bàn loại 5415D (Eppendorf) ở tốc độ 13 000 vòng/phút, 10 phút, nhiệt độ trong phòng).

Xác định mật độ quang ở độ dài bước sóng 660 nm, bằng cách sử dụng quang kế đĩa vi đĩa GENios (Tecan, Reading, UK). Các mẫu được pha loãng 1:100 bằng nước đã được khử khoáng trước khi đo.

Xác định sucroza bằng cách sử dụng hệ thử nghiệm (Cat. No. 10 716 251 035) từ R-Biopharm AG (Darmstadt, Germany). Quá trình này bao gồm sự chuyển đổi của sucroza và glucoza tạo ra được phát hiện bằng cách sử dụng thử nghiệm enzym được cặp đôi (hexokinaza/glucoza-6-phosphat dehydrogenaza) thông qua sự tạo thành NADH.

Việc xác định định lượng nồng độ axit amin ngoại bào từ dịch nổi trên bề mặt môi trường nuôi cấy được thực hiện bằng HPLC đảo pha (Lindroth et al., *Analytical Chemistry* (1979) 51: 1167-1174), sử dụng dụng cụ HPLC loại HP1100 (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany) với bộ dò huỳnh quang được nối với (G1321A); việc không chế hệ thống và đánh giá số liệu được thực hiện bằng cách sử dụng HP ChemStation (Hewlett-Packard). 1 µL dung dịch axit amin cần phân tích được trộn trong quá trình tạo dẫn xuất trước cột tự động với 20 µl chất phản ứng ortho-phthaladehyt/2-mercaptoetanol sẵn để dùng (Pierce Europe BV, Oud-Beijerland, Netherlands). Các hợp chất isoindol được thể lưu huỳnh phát huỳnh quang thu được (Jones et al., *Journal of Chromatography* (1983) 266: 471-482) được tách phân đoạn trên kết hợp của cột sơ bộ (40 × 4 mm Hypersil ODS 5) và cột chính (Hypersil ODS 5, cả hai cột đều của CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Germany) bằng cách sử dụng chương trình gradient với pha không phân cực tăng dần (metanol). Dung môi rửa giải có cực là natri axetat (0,1 M; pH 7,2); tốc độ chảy là 0,8 ml cho một phút. Huỳnh quang của các axit amin được tạo dẫn xuất được phát hiện ở độ dài bước sóng kích thích 230 nm và độ dài bước sóng phát ra 450 nm. Nồng độ của L-ornithin

và/hoặc L-ornithin hydroclorua được tính toán bằng cách so sánh với chất chuẩn ngoài và L-asparagin như là chất chuẩn nội tại bổ sung.

Trọng lượng phân tử của L-ornithin hydroclorua là $168,6 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$ và của L-ornithin là $132,1 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$.

Hiệu suất được tính bằng cách chia lượng L-ornithin được tạo ra (được đo như là L-ornithin hydroclorua) cho lượng sucroza tiêu thụ.

Các kết quả được liệt kê trong Bảng 3.

Bảng 3: Sự tạo thành L-ornithin sau 24 giờ (Bảng 3A) và 48 giờ (Bảng 3B) của quá trình ủ. Các từ viết tắt: *: ATCC 13032_Delta_argFRGH; Orn-HCl: L-ornithin hydroclorua.

Bảng 3A:

Thời gian	24 giờ		
Chủng	Orn-HCl g/l	Hiệu suất g/g	OD
*pVWEx1	$9,83 \pm 0,10$	$0,39 \pm 0,01$	$10,78 \pm 0,30$
*pVWEx1_lysE	$13,03 \pm 0,16$	$0,44 \pm 0,01$	$10,40 \pm 0,41$

Bảng 3B:

Thời gian	48 giờ		
Chủng	Orn-HCl g/l	Hiệu suất g/g	OD
*pVWEx1	$15,50 \pm 0,74$	$0,36 \pm 0,01$	$11,69 \pm 1,40$
*pVWEx1_lysE	$18,48 \pm 0,51$	$0,42 \pm 0,01$	$9,18 \pm 0,48$

Ví dụ 6: Xác định trình tự và nội dung plasmit pEC7lysE

Plasmit pEC7lysE có sẵn ở dạng dung dịch nước của Dr. Lothar Eggeling (Forschungszentrum Jülich GmbH, D-52425 Jülich), tác giả tương ứng của tài liệu công bố Bellmann et al. (Microbiology (2001) 147, 1765-1774).

Phân phân ước của dung dịch ADN thu được được sử dụng để biến nạp các tế

bào *Escherichia coli* khả biến của chủng DH5alpha (hiệu quả tạo dòng phụ, Kiểu gen: F-F80*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK-, mk+) *phoA supE44* λ- thi-1 *gyrA96 relA1*) từ Invitrogen GmbH (Paisley, UK) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Các thể biến nạp này được chọn lọc trên thạch Luria-Bertani được bổ sung 50 μg/ml kanamycin.

Một thể biến nạp được gọi là *Escherichia coli* DH5alpha/pEC7lysE(DM2204) đã được nộp lưu theo hiệp ước Budapest ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Brunswick, Germany) với số lưu giữ DSM 23239 vào ngày 15/01/2010.

Plasmit pEC7lysE từ chủng DSM 23239 được xác định trình tự hoàn toàn bằng xác định trình tự ADN thông thường (Walking Service) ở Eurofins MWG Operon GmbH (Martinsried, Germany). Trình tự của pEC7lysE được liệt kê là SEQ ID No. 29.

PCT

Dữ liệu từ máy tính (Bản gốc ở dạng điện tử)

(Trang này không phải là một phần và không được tính là một trang của đơn quốc tế)

0-1	Biểu mẫu - PCT/RO/134 (SAFE) Bảng chứng liên quan đến vi sinh vật hoặc chất liệu sinh học khác đã được nộp lưu	
0-1-1	được điều chế bằng cách sử dụng	Nộp đơn PCT điện tử Phiên bản 3.5.000.221 MT/FOP 2002701/0.20.5.9
0-2	Đơn quốc tế số	PCT/EP2011/054541
0-3	Số hồ sơ của người nộp đơn hoặc đại diện	2009P00319WO

1	Chỉ dẫn sau đây liên quan đến vi sinh vật hoặc chất liệu sinh học khác đã được nộp lưu được nêu trong bản mô tả ở:	
1-1	trang	40
1-2	dòng	12-16
1-3	Nhận diện nộp lưu	
1-3-1	Tên của cơ quan lưu giữ	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
1-3-2	Địa chỉ của cơ quan lưu giữ	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Brunswick, Germany
1-3-3	Ngày nộp lưu	15/01/2010
1-3-4	Số lưu giữ	DSMZ 23239
1-5	Các quốc gia được chỉ định mà các chỉ dẫn được dùng	Tất cả quốc gia được chỉ định

Dùng cho phòng nhận đơn

0-4	Biểu mẫu này được nhận cùng với đơn quốc tế : (có hoặc không)	có
0-4-1	Nhân viên được uỷ quyền	Gorge, Olivier

Dùng cho văn phòng quốc tế

0-5	Biểu mẫu này được văn	
-----	-----------------------	--

27068

	phòng quốc tế nhận	
0-5-1	Nhân viên được uỷ quyền	

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất L-ornithin, khác biệt ở chỗ bao gồm các bước sau đây:

a) lên men vi khuẩn tiết L-ornithin được chọn từ nhóm bao gồm *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Arthrobacter* và *Enterobacteriaceae* có biểu hiện quá mức polynucleotit mã hoá polypeptit có hoạt tính như là chất chuyển vận L-ornithin ra ngoại bào và polypeptit này có trình tự axit amin đồng nhất với trình tự axit amin SEQ ID No. 2 hoặc có trình tự axit amin có thể thu được từ SEQ ID No. 2 bằng tối đa tổng cộng 25 khuyết đoạn, cài xen, thay thế hoặc bổ sung axit amin ở đầu tận N và/hoặc đầu tận C, trong môi trường,

b) tích lũy L-ornithin nêu trên trong môi trường nêu trên, trong đó thu nhận môi trường lên men lỏng, và

c) trong đó không dùng plasmit pEC71ysE, số lưu giữ DSM23239, để biểu hiện quá mức.

2. Quy trình theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, trong trường hợp dùng *Corynebacterium glutamicum*, biểu hiện quá mức làm gia tăng hoạt tính chuyển vận L-ornithin ra ngoại bào hơn ít nhất 10% so với khi dùng ATCC13032 hoặc ATCC14067 hoặc ATCC13869.

3. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, khác biệt ở chỗ biểu hiện quá mức được thực hiện bằng một hoặc nhiều biện pháp được chọn từ nhóm bao gồm

a) gia tăng số lượng bản sao,

b) sử dụng vùng khởi đầu mạnh, và

c) gây đột biến vùng khởi đầu, và

d) biểu hiện quá mức protein là chất hoạt hoá.

4. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, khác biệt ở chỗ vi khuẩn này là *Corynebacterium*, tốt hơn nếu là *Corynebacterium glutamicum*.

5. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, khác biệt ở chỗ còn có bước giảm hoạt tính một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm

a) gen *odhA* mã hoá tiểu phần tử E1 của dehydrogenaza alpha-ketoglutarat (EC 1.2.4.2),

b) gen *sucA* mã hoá transferaza dihydroolipoamit succinyl (EC 2.3.1.61),

c) gen *dapA* mã hoá synthaza dihydrodipicolinat (DapA, EC 4.2.1.52),

d) gen *dapB* mã hoá synthaza dihydrodipicolinat (DapB, EC 1.3.1.26),

e) gen *ddh* mã hoá dehydrogenaza meso-diaminopimelat (Ddh, EC 1.4.1.16),

f) gen *lysA* mã hoá decarboxylaza diaminopimelat (LysA, EC 4.1.1.20),

g) gen *argR* mã hoá chất ức chế (ArgR) quá trình sinh tổng hợp L-arginin,

h) gen *argF* mã hoá transferaza ornithin carbamoyl (ArgF, EC 2.1.3.3),

i) gen *argG* mã hoá synthaza argininosuccinat (ArgG, EC 6.3.4.5),

j) gen *argH* mã hoá lyaza argininosuccinat (ASAL) (ArgH, EC 4.3.2.1),

k) gen *lysC* mã hoá kinaza aspartat (LysC, EC 2.7.2.4), và

l) gen *asd* mã hoá dehydrogenaza aspartat semialdehyt (Asd, EC 1.2.1.11).

6. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, khác biệt ở chỗ còn có bước tăng cường hoạt tính một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm

a) dehydrogenaza glutamat (EC 1.4.1.3) được mã hoá bởi gen *gdh*,

- b) N-axetyltransferaza glutamat (EC 2.3.1.35 và EC 2.3.1.1) được mã hoá bởi gen argJ,
- c) axetylglutamatkinaza (EC 2.7.2.8) được mã hoá bởi gen argB,
- d) Reductaza N-axetyl-gama-glutamyl-phosphat (EC 1.2.1.38) được mã hoá bởi gen argC,
- e) aminotransferaza axetylornithin (EC 2.6.1.11), được mã hoá bởi gen argD,
- f) thành phần đặc hiệu glucoza EIIB (PtsG) (EC 2.7.1.69) của hệ thống hấp thu glucoza, được mã hoá bởi gen ptsG,
- g) thành phần đặc hiệu sucroza EIIB (PtsS) (EC 2.7.1.69) của hệ thống hấp thu sucroza, được mã hoá bởi gen ptsS,
- h) glucoza-6-phosphat 1-dehydrogenaza (EC 1.1.1.49) được mã hoá bởi gen zwf,
- i) isomeraza glucoza-6-phosphat (EC 5.3.1.9) được mã hoá bởi gen pgi,
- j) phosphofructokinaza (EC 2.7.1.11) được mã hoá bởi gen pfkA,
- k) aldolaza fructoza-bisphosphat (EC 4.1.2.13) được mã hoá bởi gen fda,
- l) dehydrogenaza glyxeraldehyt-3-phosphat (EC 1.2.1.59) được mã hoá bởi gen gap,
- m) kinaza phosphoglyxerat (EC 2.7.2.3) được mã hoá bởi gen pgk,
- n) kinaza pyruvat (EC 2.7.1.40) được mã hoá bởi gen pyk,
- o) tiểu phần tử E1 của pyruvat dehydrogenaza (EC 1.2.4.1), được mã hoá bởi gen aceE,

- p) carboxylaza phosphoenolpyruvat (EC 4.1.1.31) được mã hoá bởi gen ppc,
- q) pyruvat carboxylaza (EC 6.4.1.1), được mã hoá bởi gen pyc,
- r) aconitaza (EC 4.2.1.3) được mã hoá bởi gen acn, và
- s) dehydrogenaza isoxitrat (EC 1.1.1.42) được mã hoá bởi gen icd.

7. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, khác biệt ở chỗ quy trình này là quy trình được chọn từ nhóm bao gồm quy trình gián đoạn (batch process), quy trình gián đoạn bổ sung chất dinh dưỡng (fed-batch process), quy trình gián đoạn bổ sung chất dinh dưỡng lặp lại (repetitive fed-batch process), và quy trình liên tục (continuous process).

8. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, khác biệt ở chỗ L-ornithin hoặc sản phẩm chứa L-ornithin lỏng hoặc rắn được thu hồi từ môi trường lên men lỏng chứa L-ornithin.

Fig 1

```

YP_225551.1 -----MEIFITGLLLGASLLLSIGPQNVLVIKQGIKREGLIAVLLV
ZP_05749209.1 -----MEIFVTGLLLGASLLLAIGPQNVLVIKQGIKREGITAVIIV
NP_939452.1 -----MSIAIAGFLMGLSLIVAIGPQNALIIRQGIKREGLIPILVV
ZP_03933958.1 -----MSVLLAGFLLGLSLIVAIGPQONAYIIKMGVKRDHIGAITLA
YP_002834652.1 MRRLEA-----MSVLLAGFALGLSLIIAIGPQONAYIIKMGIKRDHVGPIILA
ZP_03711883.1 -----MSIAVAGFLLGLSLIVAIGPQONALVIRQGVKREGLIVVLAI
ZP_03922319.1 -----MSIVLAGFLLGLSLIVAVGPQONAMLLKYGIRRDHIGLIIVV
ZP_03931790.1 -----MSIVLAGFVLGLSLIVAVGPQONAMLLKYGIRRDHIGLIIVV
ZP_03918361.1 MVPENLSFYLCVLLTHNKYVNVFFAGLLFNLSLILALGPQONALILKYGLRRQAITLVISV
YP_002958101.1 M-----WTLAGTGLLTGLALIVAIGAQNFAVLRQGVRRHVGAVVLV
ZP_05365683.1 -----MSIVLAGFLLGLSLIVAVGPQONAMLLKYGIRRDHIGLIIVV
ZP_04835056.1 -----MSIAVAGFLLGLSLIVAIGPQONALVIRQGVKREGLIVVLAI

```

* * * * *

```

YP_225551.1 CLISDVFLFIAGTLGVLLSNAAPIVLDIMRWGGIAYLLWFAVMAAKDAMTNKVEA----
ZP_05749209.1 CLISDVVLFITLGTGLVGLISDTAPIILDILRWCGIAYLLWFAVMAARDALRARETV----
NP_939452.1 CLISDVILIFGGTAGVGALVDRAPIALVVLKWLGVAYLLVYFGFTCFKEAFKRHQQA----
ZP_03933958.1 CLISDVILINAGVGGMGVLVEKFPPTGLIIMKYLGAAAYLIYFGFTCFRDAFKKQEA----
YP_002834652.1 CLISDVILITGGTAGVGLVERFPTALVVVKYLGAAYLIYFGFTCFRDAFKKQQA----
ZP_03711883.1 CLISDIFLIFGGTAGVGVIIIEKAPLALVALKWFGAAYLAWFAVSCFRDMV--KPR-----
ZP_03922319.1 CALSDVILITSGTAGVGVLEKFPNALQVLKYVGAAYLAYFTFTCFRDAFKTKGEA----
ZP_03931790.1 CALSDVILITSGTAGVGVLEKFPNALBALKYIGAAYLAFFFTCFRDAFKTKGEAIDVE
ZP_03918361.1 CALCDITLIALSGVGVVILQKAPITVLEILRYAGFLYLLWFAYTCTFRDAIHPKTLA----
YP_002958101.1 CMASDAVLILAGTAGVGALVQAVPWLLLEVLRWGGALYLLWFAVSSLRAL-----R----
ZP_05365683.1 CALSDVILITSGTAGVGVLEKFPNALQVLKYVGAAYLAYFTFTCFRDAFKTKGEA----
ZP_04835056.1 CMLSDIFLIFGGTAGVGVIIIEKAPLALVALKWFGAAYLAWFAVSCFKDMVKPRALD----

```

* * * * *

```

YP_225551.1 ---PQ-IIE---ETEP---T--VP---D-DTP-LG-----G-----SAVAT
ZP_05749209.1 ---T--FVE---HSEP---V--AA---A-SAS-GG-----G-----V
NP_939452.1 ---L-AVE---QSEP---V--AY---E-PVA-DA-----S-----SGVIT
ZP_03933958.1 ---L-VVS---STPP---S--AP---N-ETE-LG-----G-----ATTV
YP_002834652.1 ---L-VIE---ETTP---VAQVV---D-ENS-GN-----A-----GAPGT
ZP_03711883.1 ---LD-SSA---TDDG---T--SL---D-DAP-TAAHVSNDVTTSG----NGGQV
ZP_03922319.1 ---IE-V-E---STQP---K--AP---Q-EVASFD-----G-----SQARS
ZP_03931790.1 STSPN-STE---EVAT---F--DG---D-GDS-TG-----GVTGTHGSVAT
ZP_03918361.1 ---TE-TVS---ETKPHEEE--LP---DVSST-TA-----G-----TTMAT
YP_002958101.1 ---PQGLMA---EQAP---R--T---A-----G-----SVIAT
ZP_05365683.1 ---IE-V-E---STQP---K--VP---Q-EVASFD-----G-----SQARN
ZP_04835056.1 ---SS-ATDNGTSLDDAP---T--VAHISNVD--STS--GN-----G-----GQVQT

```

```

YP_225551.1 DTRNRVRVEVS--VDKQ---RVWVK-----PMLMAIVLTWLNPNAYLDAFVFIGGVG
ZP_05749209.1 TTKQRPRLRIT--SGTR---QVWVR-----PMLMAIVLTWLNPNAYLDAFVFIGGVG
NP_939452.1 KTRTKAQPK----SAQ---RTWVK-----PVLAAALFTWLNPAAYIDVLVMLGGIA
ZP_03933958.1 MTKQRT-----KS---RTWVK-----PVMGAMALTWLNPLAYVDVLVMLGGIA
YP_002834652.1 SVLTKIRPRV---RS---KSWVK-----PVLGALALTWLNPLAYVDALVMLGSIA
ZP_03711883.1 QTKTRPITTTA--PTRQAHPARPVVK-----PALAALFTWLNPSAYIDTLVMLGGIA
ZP_03922319.1 TTKTAARVEIK---RS---PSWVK-----PLLTALALTWLNPGAYVDVVMLGSIA
ZP_03931790.1 ATATQ-RQEIK---RS---PSWVK-----PLLTALALTWLNPGAYVDVLVMLGGIA
ZP_03918361.1 ATVMETATTVK--EKTH-----RRTFHPHQEIKGPAVAAPVSVINPAAWDLFVVGISIS
YP_002958101.1 -----TLALTWLNPHVLDTVVLLGSLA

```

ZP_05365683.1
ZP_04835056.1

TTKTATRVEIK----RS----PSWVK-----PLLALALTWLNPGAYVDVVVMLGSIA
KTRPITTTAPTRQAHPA----RPWVK-----PALAALAPTWLNPSAYIDTLVMLGGIA
* * * *

YP_225551.1
ZP_05749209.1
NP_939452.1
ZP_03933958.1
YP_002834652.1
ZP_03711883.1
ZP_03922319.1
ZP_03931790.1
ZP_03918361.1
YP_002958101.1
ZP_05365683.1
ZP_04835056.1

AQYGDTGRWIFAAGAFASLIWFPLVGFCAAALSRLSSPKVWRWINVVAVVMTALAIK
AQYGETGRWIFAAGAFASLVWFPLVGYGAAALSRLSSPRVWRWINIGVAVVLTGLAVK
NQHGPDGRWVFAAGALCASLTWFPFIGYTSTRFSTVLSRPVWRYINIAIGIIMMIMCAR
QHYGDQ-RWVFAAGAIMASAVWFPVGYGAFKLSHVLAAPTWRVYNFAIGCVMLLTAK
NQYGDQ-RWVFAAGAILASAVWFPPLGFGAYKLSHVLAAPTWRVYNIVIGCVMLALTAK
NQHGESGRWVFAAGALMASAVWFPPLGFFSTRFSRVLSRPQAWRVINGVIGCIMVVMCIR
NQYGESGRWLFVGAICASFPTWFPFIGFGAARFHVLSRPTVWRWINFGIGVIMIGLTLK
NQYGDPRWLFAGGAIAASFTWFPVIGFGAARFHVLSRPEVWRWINVIGIGVIMIGLTLK
SSYGP-DKWAFLLLGTMAASLVWFPFAGYGAAALSRLSSPKVWRRCINTGIGLFMVFMFR
NQHGPDARWVFAAGAVAASVLWFTALGYGARLLARVLADPKAWRVVDVVIAVVMVLAVER
NQYGESGRWLFVGAICASFPTWFPFIGFGAARFHVLSRPTVWRWINFGIGVIMIGLTLK
NQHGESGRWVFAAGALMASAVWFPPLGFFSTRFSRVLSRPQAWRVINGVIGCIMVVMCIR
* * * * *

YP_225551.1
ZP_05749209.1
NP_939452.1
ZP_03933958.1
YP_002834652.1
ZP_03711883.1
ZP_03922319.1
ZP_03931790.1
ZP_03918361.1
YP_002958101.1
ZP_05365683.1
ZP_04835056.1

LMLMG----
LILMG----
LIMH-----
LLH-----
LLFL-----
LVMH-----
LLLL-----
VLFM-----
LIAGSDVWG
LLLL-----
LIMH-----

Fig 2

Compare Two Sequences

Comparison type

☐ Local Find regions of local similarity between two molecules. Param

Method: Report:

☐ Assembled Progressively assemble an alignment using local similarities.
Use for sequences with some similar and some different regions.

☒ Global Maximize alignment of bases along full length of both molecules.
Use for sequences that are very similar overall.

Compare sequences as ...

☐ DNA bases ☒ Compare both strands

☒ Amino acids (translate in frame, as needed)

☐ Translation, display as DNA

Scoring matrix

☐ Standard Linear

☒ BLOSUM 62

☐ PAM 250

< Zurück Weiter > Abbrechen Hilfe

Danh mục trình tự

5	<110> Evonik Degussa GmbH	
	<120> Quy trình sản xuất L-ornithin bằng cách lên men	
	<130> 200900319	
10	<160> 30	
	<170> Phiên bản PatentIn 3.3	
15	<210> 1	
	<211> 1901	
	<212> ADN	
	<213> Corynebacterium glutamicum ATCC13032	
20	<220>	
	<221> dấu hiệu misc	
	<222> (930)..(61)	
	<223> Komplementärer Strang der Kodierregion des Regulatorgens lysG kodierend für das Aktivatorprotein LysG	
25	<220>	
	<221> dấu hiệu misc	
	<222> (1000)..(1000)	
	<223> Transkriptionsstart des lysE-Gens	
30	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1001)..(1702)	
	<223> Kodierregion des lysE-Gens	
35	<400> 1	
	cctggcccaa ttcctgcggg cgaagaagtg aaaaaccctg aaccttttca gaagtaacta	60
40	aggccgcaat ccctcgattg ctgcatcaac gacggcgtct gtgagtctag ctagagatct	120
	agattccagg cgccatcggt gccaatatcat cgggtgtgtca atgggtatct catcgaggag	180
	gatcacttct cctgctttta gcatgggagc agcttggggt tcgggaagaa gtccccaacc	240
45	aaggcctcgg cgaattgcct caccaaaacc ttccgccgac gggacaatgg atacgcgcct	300
	gcgccccaca ggaccatcga cgcgcccgtc caggtcacgg tcttgaagca catctttggg	360
50	accgaagcgt aagacgggca tcgcagccca atctagtttc ccatcaacca tgtaggcatc	420
	ccgcaatgag ggggttgcaa tggccaagtg gcgcatgggt ccaagttcta ctacttcaca	480
	tcccgccacg ggattagctt cacgggttac cgctcctaaa acatctccac gccgcagcaa	540
55	ggataatgtg tgcgcttcat cttccaagcg cagcgtgagc gttgctccac cccaagaagc	600
	tacctcgttg aacacgggag gaaaccatgt ggatagcgaa tctgcgttga tggcgatggg	660
	taacgggatt tcagcaaggc gtccagatag ttgcgcttta gtttctgctt gcagcaacac	720
60	cattttccgc gctgcttgca caaggacttc acccgcttcg gttgctttgg ccggttgggt	780

	gcgcgatacc aacactcgac ccacgtgatg ctcgagagct ttaacgcgct gactcaccgc	840
	cgagggggaa atggaaaggg ctaaggaggc gccttcgaag ctgccttcat caatgattga	900
5	gagcaaagtg tccagttgaa tggggttcat gaagctatat taaaccatgt taagaaccaa	960
	tcattttact taagtacttc cataggtcac gatggtgatc atg gaa atc ttc att	1015
		Met Glu Ile Phe Ile
		1 5
10	aca ggt ctg ctt ttg ggg gcc agt ctt tta ctg tcc atc gga ccg cag	1063
	Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser Leu Leu Leu Ser Ile Gly Pro Gln	
		10 15 20
15	aat gta ctg gtg att aaa caa gga att aag cgc gaa gga ctc att gcg	1111
	Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly Ile Lys Arg Glu Gly Leu Ile Ala	
		25 30 35
	gtt ctt ctc gtg tgt tta att tct gac gtc ttt ttg ttc atc gcc ggc	1159
20	Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Val Phe Leu Phe Ile Ala Gly	
		40 45 50
	acc ttg ggc gtt gat ctt ttg tcc aat gcc gcg ccg atc gtg ctc gat	1207
25	Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser Asn Ala Ala Pro Ile Val Leu Asp	
		55 60 65
	att atg cgc tgg ggt ggc atc gct tac ctg tta tgg ttt gcc gtc atg	1255
	Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala Tyr Leu Leu Trp Phe Ala Val Met	
		70 75 80 85
30	gca gcg aaa gac gcc atg aca aac aag gtg gaa gcg cca cag atc att	1303
	Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn Lys Val Glu Ala Pro Gln Ile Ile	
		90 95 100
35	gaa gaa aca gaa cca acc gtg ccc gat gac acg cct ttg ggc ggt tcg	1351
	Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro Asp Asp Thr Pro Leu Gly Gly Ser	
		105 110 115
	gcg gtg gcc act gac acg cgc aac cgg gtg cgg gtg gag gtg agc gtc	1399
40	Ala Val Ala Thr Asp Thr Arg Asn Arg Val Arg Val Glu Val Ser Val	
		120 125 130
	gat aag cag cgg gtt tgg gta aag ccc atg ttg atg gca atc gtg ctg	1447
45	Asp Lys Gln Arg Val Trp Val Lys Pro Met Leu Met Ala Ile Val Leu	
		135 140 145
	acc tgg ttg aac ccg aat gcg tat ttg gac gcg ttt gtg ttt atc ggc	1495
	Thr Trp Leu Asn Pro Asn Ala Tyr Leu Asp Ala Phe Val Phe Ile Gly	
		150 155 160 165
50	ggc gtc ggc gcg caa tac ggc gac acc gga cgg tgg att ttc gcc gct	1543
	Gly Val Gly Ala Gln Tyr Gly Asp Thr Gly Arg Trp Ile Phe Ala Ala	
		170 175 180
55	ggc gcg ttc gcg gca agc ctg atc tgg ttc ccg ctg gtg ggt ttc ggc	1591
	Gly Ala Phe Ala Ala Ser Leu Ile Trp Phe Pro Leu Val Gly Phe Gly	
		185 190 195
	gca gca gca ttg tca cgc ccg ctg tcc agc ccc aag gtg tgg cgc tgg	1639
60	Ala Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu Ser Ser Pro Lys Val Trp Arg Trp	
		200 205 210
	atc aac gtc gtc gtg gca gtt gtg atg acc gca ttg gcc atc aaa ctg	1687

Ile Asn Val Val Val Ala Val Val Met Thr Ala Leu Ala Ile Lys Leu
 215 220 225

5 atg ttg atg ggt tag ttttcgctggg ttttggaatc ggtggccttc gcccaaagt 1742
 Met Leu Met Gly
 230

10 tgatgccggc gtcgtgggaa atctcatcga tcgcctccaa ctccgctca gaaaactcca 1802
 agttgttgag tgaatcaagg ctgtgtcca gctgctcaac tgacgaagca ccaatcaatg 1862
 cactgggtcac ggtatccgcg ccgtactctc cttgctcgc 1901

15 <210> 2
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum ATCC13032

20 <400> 2

Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser Leu Leu Leu
 1 5 10 15

25 Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly Ile Lys Arg
 20 25 30

30 Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Val Phe
 35 40 45

35 Leu Phe Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser Asn Ala Ala
 50 55 60

40 Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala Tyr Leu Leu
 65 70 75 80

Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn Lys Val Glu
 85 90 95

45 Ala Pro Gln Ile Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro Asp Asp Thr
 100 105 110

50 Pro Leu Gly Gly Ser Ala Val Ala Thr Asp Thr Arg Asn Arg Val Arg
 115 120 125

55 Val Glu Val Ser Val Asp Lys Gln Arg Val Trp Val Lys Pro Met Leu
 130 135 140

60 Met Ala Ile Val Leu Thr Trp Leu Asn Pro Asn Ala Tyr Leu Asp Ala
 145 150 155 160

Phe Val Phe Ile Gly Gly Val Gly Ala Gln Tyr Gly Asp Thr Gly Arg
 165 170 175

Trp Ile Phe Ala Ala Gly Ala Phe Ala Ala Ser Leu Ile Trp Phe Pro
 180 185 190
 5
 Leu Val Gly Phe Gly Ala Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 10
 Lys Val Trp Arg Trp Ile Asn Val Val Val Ala Val Val Met Thr Ala
 210 215 220
 15
 Leu Ala Ile Lys Leu Met Leu Met Gly
 225 230
 20
 <210> 3
 <211> 761
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum ATCC13032
 25
 <220>
 <221> Đoạn PCR-lyse
 <222> (1)..(761)
 30
 <400> 3
 tcgatatcat ggaaatcttc attacaggtc tgcttttggg gccagtctt ttactgtcca 60
 tcggaccgca gaatgtactg gtgattaaac aaggaattaa gcgcgaagga ctcattgcgg 120
 ttcttctcgt gtgtttaatt tctgacgtct ttttgttcat cgccggcacc ttgggcgttg 180
 35
 atcttttgtc caatgccgcg ccgatcgtgc tcgatattat gcgctggggg ggcatcgctt 240
 acctgttatg gtttgccgtc atggcagcga aagacgccat gacaaacaag gtggaagcgc 300
 40
 cacagatcat tgaagaaaca gaaccaaccg tgcccgatga cacgcctttg ggcggttcgg 360
 cggtagccac tgacacgcgc aaccgggtgc gggtaggagt gagcgtcgat aagcagcggg 420
 45
 tttgggtaaa gcccatgttg atggcaatcg tgctgacctg gttgaaccgc aatgcgtatt 480
 tggacgcgtt tgtgtttatc ggcggcgtcg gcgcgcaata cggcgacacc ggacggtgga 540
 ttttcgccgc tggcgcgctt gcggcaagcc tgatctggtt cccgctggtg ggtttcggcg 600
 50
 cagcagcatt gtcacgcccg ctgtccagcc ccaaggtgtg gcgctggatc aacgtcgctc 660
 tggcagttgt gatgaccgca ttggccatca aactgatgtt gatgggtag ttttcgcggg 720
 55
 ttttggaatc ggtggccttc gcccaaatat tgacctaggc a 761
 60
 <210> 4
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum R
 <220>

<221> LysE
 <222> (1)..(236)
 <400> 4

5 Met Val Ile Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser
 1 5 10 15

10 Leu Leu Leu Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly
 20 25 30

15 Ile Lys Arg Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser
 35 40 45

20 Asp Val Phe Leu Phe Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser
 50 55 60

25 Asn Ala Ala Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala
 65 70 75 80

Tyr Leu Leu Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn
 85 90 95

30 Lys Val Glu Ala Pro Gln Ile Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro
 100 105 110

35 Asp Asp Thr Pro Leu Gly Gly Ser Ala Val Ala Thr Asp Thr Arg Asn
 115 120 125

40 Arg Val Arg Val Glu Val Ser Val Asp Lys Gln Arg Val Trp Val Lys
 130 135 140

45 Pro Met Leu Met Ala Ile Val Leu Thr Trp Leu Asn Pro Asn Ala Tyr
 145 150 155 160

Leu Asp Ala Phe Val Phe Ile Gly Gly Val Gly Ala Gln Tyr Gly Asp
 165 170 175

50 Thr Gly Arg Trp Ile Phe Ala Ala Gly Ala Phe Ala Ala Ser Leu Ile
 180 185 190

55 Trp Phe Pro Leu Val Gly Phe Gly Ala Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu
 195 200 205

60 Ser Ser Pro Lys Val Trp Arg Trp Ile Asn Val Val Val Ala Val Val
 210 215 220

Met Thr Ala Leu Ala Ile Lys Leu Met Leu Met Gly
 225 230 235

<210> 5
 <211> 233
 5 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum ATCC14067

<220>
 10 <221> LysE
 <222> (1)..(233)
 <400> 5

15 Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser Leu Leu Leu
 1 5 10 15

20 Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly Ile Lys Arg
 20 25 30

25 Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Val Phe
 35 40 45

30 Leu Phe Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser Asn Ala Ala
 50 55 60

35 Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala Tyr Leu Leu
 65 70 75 80

40 Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn Lys Val Glu
 85 90 95

45 Ala Pro Gln Ile Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro Asp Asp Thr
 100 105 110

50 Pro Leu Gly Gly Ser Ala Val Ala Thr Asp Thr Arg Asn Arg Val Arg
 115 120 125

55 Val Glu Val Ser Val Asp Lys Gln Arg Val Trp Val Lys Pro Met Leu
 130 135 140

60 Met Ala Ile Val Leu Thr Trp Leu Asn Pro Asn Ala Tyr Leu Asp Ala
 145 150 155 160

65 Phe Val Phe Ile Gly Gly Val Gly Ala Gln Tyr Gly Asp Thr Gly Arg
 165 170 175

70 Trp Ile Phe Ala Ala Gly Ala Phe Ala Ala Ser Leu Ile Trp Phe Pro
 180 185 190

75 Leu Val Gly Phe Gly Ala Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu Ser Ser Pro

195 200 205

5 Lys Val Trp Arg Trp Ile Asn Val Val Val Ala Val Val Met Thr Ala
210 215 220

10 Leu Ala Ile Lys Leu Met Leu Met Gly
225 230

<210> 6
<211> 702
<212> ADN
15 <213> Corynebacterium glutamicum ATCC14067

<220>
20 <221> lysE-CDS
<222> (1)..(702)

<400> 6
atggaaatct tcattacagg tctgcttttg ggggccagtc ttttgcgtgc catcggaccg 60
25 cagaatgtac tgggtgattaa acaaggaatt aagcgcgaag gactcattgc ggttcttctc 120
gtgtgttttaa tttctgacgt ctttttggtc atcgccggca ccttgggcgt tgatcttttg 180
tccaatgccg cgccgatcgt gctcgatatt atgcgctggg gtggtatcgc ttacctgtta 240
30 tggtttgccg tcatggcagc gaaagacgcc atgacaaaca aggtggaagc gccacagatc 300
attgaagaaa cagaaccaac cgtgcccgat gacacgcctt tgggcggttc ggcggtggcc 360
35 actgacacgc gcaaccgggt gcgggtggag gtgagcgtcg ataagcagcg ggtttgggta 420
aagcccatgt tgatggcaat cgtgctgacc tggttgaacc cgaatgcgta tttggacgcg 480
40 tttgtgttta tcggcggcgt cggcgcgcaa tacggcgaca ccggacggtg gattttcgcc 540
gctggcgcgt tcgcggcaag cctgatctgg ttcccgtggg tgggtttcgg cgcagcagca 600
ttgtcacgcc cgctgtccag cccaaggtg tggcgtgga tcaacgtcgt cgtggcagtt 660
45 gtgatgaccg cattggccat caaactgatg ttgatgggtt ag 702

<210> 7
50 <211> 233
<212> PRT
<213> Corynebacterium glutamicum ATCC13869

<220>
55 <221> LysE
<222> (1)..(233)

<400> 7
60 Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser Leu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly Ile Lys Arg
 20 25 30

5 Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Val Phe
 35 40 45

10 Leu Phe Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser Asn Ala Ala
 50 55 60

15 Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala Tyr Leu Leu
 65 70 75 80

Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn Lys Val Glu
 85 90 95

20 Ala Pro Gln Ile Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro Asp Asp Thr
 100 105 110

25 Pro Leu Gly Gly Ser Ala Val Ala Thr Asp Thr Arg Asn Arg Val Arg
 115 120 125

30 Val Glu Val Ser Val Asp Lys Gln Arg Val Trp Val Lys Pro Met Leu
 130 135 140

35 Met Ala Ile Val Leu Thr Trp Leu Asn Pro Asn Ala Tyr Leu Asp Ala
 145 150 155 160

Phe Val Phe Ile Gly Gly Val Gly Ala Gln Tyr Gly Asp Thr Gly Arg
 165 170 175

40 Trp Ile Phe Ala Ala Gly Ala Phe Ala Ala Ser Leu Ile Trp Phe Pro
 180 185 190

45 Leu Val Gly Phe Gly Ala Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu Ser Ser Pro
 195 200 205

50 Lys Val Trp Arg Trp Ile Asn Val Val Val Ala Val Val Met Thr Ala
 210 215 220

55 Leu Ala Ile Lys Leu Met Leu Met Gly
 225 230

<210> 8
 <211> 702
 <212> ADN
 60 <213> Corynebacterium glutamicum ATCC13869
 <220>

<221> lysE-CDS
 <222> (1)..(702)

<400> 8

5 atggaaatct tcattacagg tctgcttttg ggggccagtc ttttgctgtc catcggaccg 60
 cagaatgtac tgggtgattaa acaaggaatt aagcgcgaag gactcattgc gggtcttctc 120
 gtgtgttttaa tttctgacgt ctttttggtc atcgccggca ccttgggcgt tgatcttttg 180
 10 tccaatgccg cgccgatcgt gctcgatatt atgcgctggg gtggcatcgc ttacctgtta 240
 tggtttgccg tcatggcagc gaaagacgcc atgacaaaaca aggtggaagc gccacagatc 300
 15 attgaagaaa cagaaccaac cgtgcccgat gacacgcctt tgggcggttc ggcggtggcc 360
 actgacacgc gcaaccgggt gcgggtggag gtgagcgtcg ataagcagcg gggttgggtg 420
 aagcccatgt tgatggcaat cgtgctgacc tggttgaacc cgaatgcgta tttggacgcg 480
 20 tttgtgttta tcggcggcgt cggcgcgcaa tacggcgaca ccggacggtg gattttcgcc 540
 gctggcgcgt tcggcgcaag cctgatctgg ttcccgtgg tgggtttcgg cgcagcagca 600
 25 ttgtcacgcc cgctgtccag cccaaggtg tggcgtgga tcaacgtcgt cgtggcagtt 660
 gtgatgaccg cattggccat caaactgatg ttgatgggtt ag 702

30 <210> 9
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium efficiens YS-314

35 <220>
 <221> LySE
 <222> (1)..(228)

40 <400> 9

Met Glu Ile Phe Val Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser Leu Leu Leu
 1 5 10 15

45 Ala Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly Ile Lys Arg
 20 25 30

50 Glu Gly Ile Thr Ala Val Ile Ile Val Cys Leu Leu Ser Asp Val Val
 35 40 45

55 Leu Phe Thr Leu Gly Thr Leu Gly Val Gly Leu Ile Ser Asp Thr Ala
 50 55 60

60 Pro Ile Ile Leu Asp Ile Leu Arg Trp Cys Gly Ile Ala Tyr Leu Leu
 65 70 75 80

Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Arg Asp Ala Leu Arg Ala Arg Thr Glu
 85 90 95

Val Thr Phe Val Glu His Ser Glu Pro Val Ala Ala Ala Ser Ala Ser
 100 105 110
 5
 Gly Gly Gly Val Thr Thr Lys Gln Arg Pro Arg Leu Arg Ile Thr Ser
 115 120 125
 10
 Gly Thr Arg Gln Val Trp Val Arg Pro Met Leu Met Ala Ile Val Leu
 130 135 140
 15
 Thr Trp Leu Asn Pro Asn Ala Tyr Leu Asp Ala Phe Val Phe Ile Gly
 145 150 155 160
 20
 Gly Val Gly Ala Gln Tyr Gly Glu Thr Gly Arg Trp Ile Phe Ala Ala
 165 170 175
 Gly Ala Phe Ala Ala Ser Leu Val Trp Phe Pro Leu Val Gly Tyr Gly
 180 185 190
 25
 Ala Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu Ser Ser Pro Arg Val Trp Arg Trp
 195 200 205
 30
 Ile Asn Ile Gly Val Ala Val Val Leu Thr Gly Leu Ala Val Lys Leu
 210 215 220
 35
 Ile Leu Met Gly
 225
 40
 <210> 10
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium diptheriae NCTC13129
 45
 <220>
 <221> LysE
 <222> (1)..(228)
 <400> 10
 50
 Met Ser Ile Ala Ile Ala Gly Phe Leu Met Gly Leu Ser Leu Ile Val
 1 5 10 15
 55
 Ala Ile Gly Pro Gln Asn Ala Leu Ile Ile Arg Gln Gly Ile Lys Arg
 20 25 30
 60
 Glu Gly Leu Ile Pro Ile Leu Val Val Cys Ile Leu Ser Asp Val Ile
 35 40 45
 Leu Ile Phe Gly Gly Thr Ala Gly Val Gly Ala Leu Val Asp Arg Ala

	50	55	60
5	Pro Ile Ala Leu Val Val Leu Lys Trp Leu Gly Val Ala Tyr Leu Leu 65 70 75 80		
10	Tyr Phe Gly Phe Thr Cys Phe Lys Glu Ala Phe Lys Arg His Gly Gln 85 90 95		
15	Ala Leu Ala Val Glu Gln Ser Glu Pro Val Ala Tyr Glu Pro Val Ala 100 105 110		
20	Asp Ala Ser Ser Gly Val Ile Thr Lys Thr Arg Thr Lys Ala Gln Pro 115 120 125		
25	Lys Ser Ala Gln Arg Thr Trp Val Lys Pro Val Leu Ala Ala Leu Ala 130 135 140		
30	Phe Thr Trp Leu Asn Pro Ala Ala Tyr Ile Asp Val Leu Val Met Leu 145 150 155 160		
35	Gly Gly Ile Ala Asn Gln His Gly Pro Asp Gly Arg Trp Val Phe Ala 165 170 175		
40	Leu Gly Ala Leu Cys Ala Ser Leu Thr Trp Phe Pro Phe Ile Gly Tyr 180 185 190		
45	Thr Ser Thr Arg Phe Ser Thr Val Leu Ser Arg Pro Ala Val Trp Arg 195 200 205		
50	Tyr Ile Asn Ile Ala Ile Gly Ile Ile Met Met Ile Met Cys Ala Arg 210 215 220		
55	Leu Ile Met His 225		
60	<210> 11 <211> 222 <212> PRT <213> Corynebacterium striatum ATCC6940 <220> <221> LysE <222> (1)..(222) <400> 11 Met Ser Val Leu Leu Ala Gly Phe Leu Leu Gly Leu Ser Leu Ile Val 1 5 10 15		

Ala Ile Gly Pro Gln Asn Ala Tyr Ile Ile Lys Met Gly Val Lys Arg
20 25 30

5 Asp His Ile Gly Ala Ile Ile Leu Ala Cys Leu Leu Ser Asp Val Ile
35 40 45

10 Leu Ile Asn Ala Gly Val Gly Gly Met Gly Val Leu Val Glu Lys Phe
50 55 60

15 Pro Thr Gly Leu Ile Ile Met Lys Tyr Leu Gly Ala Ala Tyr Leu Ile
65 70 75 80

Tyr Phe Gly Phe Thr Cys Phe Arg Asp Ala Phe Lys Lys Glu Gln Glu
85 90 95

20 Ala Leu Val Val Ser Ser Thr Pro Pro Ser Ala Pro Asn Glu Thr Glu
100 105 110

25 Leu Gly Gly Ala Thr Thr Val Met Thr Lys Gln Arg Thr Lys Ser Arg
115 120 125

30 Thr Trp Val Lys Pro Val Met Gly Ala Met Ala Leu Thr Trp Leu Asn
130 135 140

35 Pro Leu Ala Tyr Val Asp Val Leu Val Met Leu Gly Gly Ile Ala Gln
145 150 155 160

His Tyr Gly Asp Gln Arg Trp Val Phe Ala Ala Gly Ala Ile Met Ala
165 170 175

40 Ser Ala Val Trp Phe Pro Thr Val Gly Tyr Gly Ala Phe Lys Leu Ser
180 185 190

45 His Val Leu Ala Lys Pro Thr Thr Trp Arg Tyr Val Asn Phe Ala Ile
195 200 205

50 Gly Cys Val Met Met Leu Leu Thr Ala Lys Leu Leu Leu His
210 215 220

<210> 12
<211> 235
55 <212> PRT
<213> Corynebacterium aurimucosum ATCC700975

<220>
60 <221> LysE
<222> (1)..(235)

<400> 12

Met Arg Arg Leu Glu Ala Met Ser Val Leu Leu Ala Gly Phe Ala Leu
 1 5 10 15
 5 Gly Leu Ser Leu Ile Ile Ala Ile Gly Pro Gln Asn Ala Tyr Ile Ile
 20 25 30
 10 Lys Met Gly Ile Lys Arg Asp His Val Gly Pro Ile Leu Leu Ala Cys
 35 40 45
 15 Leu Leu Ser Asp Val Ile Leu Ile Thr Gly Gly Thr Ala Gly Val Gly
 50 55 60
 20 Val Leu Val Glu Arg Phe Pro Thr Ala Leu Val Val Val Lys Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gly Ala Ala Tyr Leu Ile Tyr Phe Gly Phe Thr Cys Phe Arg Asp Ala
 85 90 95
 25 Phe Lys Lys Gln Gln Asp Ala Leu Val Ile Glu Glu Thr Thr Pro Val
 100 105 110
 30 Ala Gln Val Val Asp Glu Asn Ser Gly Asn Ala Gly Ala Pro Gly Thr
 115 120 125
 35 Ser Val Leu Thr Lys Ile Arg Pro Arg Val Arg Ser Lys Ser Trp Val
 130 135 140
 40 Lys Pro Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Thr Trp Leu Asn Pro Leu Ala
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Ala Leu Val Met Leu Gly Ser Ile Ala Asn Gln Tyr Gly
 165 170 175
 45 Asp Gln Arg Trp Val Phe Ala Gly Gly Ala Ile Leu Ala Ser Ala Val
 180 185 190
 50 Trp Phe Pro Ser Leu Gly Phe Gly Ala Tyr Lys Leu Ser His Val Leu
 195 200 205
 55 Ala Lys Pro Thr Thr Trp Arg Val Val Asn Ile Val Ile Gly Cys Val
 210 215 220
 60 Met Leu Ala Leu Thr Ala Lys Leu Leu Phe Leu
 225 230 235
 <210> 13
 <211> 244

<212> PRT
 <213> Corynebacterium matruchotii ATCC33806

5 <220>
 <221> LysE
 <222> (1)..(244)

<400> 13

10 Met Ser Ile Ala Val Ala Gly Phe Leu Leu Gly Leu Ser Leu Ile Val
 1 5 10 15

15 Ala Ile Gly Pro Gln Asn Ala Leu Val Ile Arg Gln Gly Val Lys Arg
 20 25 30

20 Glu Gly Leu Ile Val Val Leu Ala Ile Cys Ile Leu Ser Asp Ile Phe
 35 40 45

25 Leu Ile Phe Gly Gly Thr Ala Gly Val Gly Val Ile Ile Glu Lys Ala
 50 55 60

30 Pro Leu Ala Leu Val Ala Leu Lys Trp Phe Gly Ala Ala Tyr Leu Ala
 65 70 75 80

35 Trp Phe Ala Val Ser Cys Phe Arg Asp Met Val Lys Pro Arg Ala Leu
 85 90 95

40 Asp Ser Ser Ala Thr Asp Asp Gly Thr Ser Leu Asp Asp Ala Pro Thr
 100 105 110

45 Ala Ala His Val Ser Asn Val Asp Thr Thr Ser Gly Asn Gly Gly Gln
 115 120 125

50 Val Gln Thr Lys Thr Arg Pro Ile Thr Thr Thr Ala Pro Thr Arg Gln
 130 135 140

55 Ala His Pro Ala Arg Pro Trp Val Lys Pro Ala Leu Ala Ala Leu Ala
 145 150 155 160

60 Phe Thr Trp Leu Asn Pro Ser Ala Tyr Ile Asp Thr Leu Val Met Leu
 165 170 175

65 Gly Gly Ile Ala Asn Gln His Gly Glu Ser Gly Arg Trp Val Phe Ala
 180 185 190

70 Ala Gly Ala Leu Met Ala Ser Ala Val Trp Phe Pro Leu Leu Gly Phe
 195 200 205

75 Phe Ser Thr Arg Phe Ser Arg Val Leu Ser Arg Pro Gln Ala Trp Arg

210 215 220
 5 Val Ile Asn Gly Val Ile Gly Cys Ile Met Val Val Met Cys Ile Arg
 225 230 235 240

 Leu Val Met His
 10
 <210> 14
 <211> 230
 <212> PRT
 15 <213> Corynebacterium pseudogenitalium ATCC33035

 <220>
 <221> Lyse
 20 <222> (1)..(230)

 <400> 14
 Met Ser Ile Val Leu Ala Gly Phe Phe Leu Gly Leu Ser Leu Ile Val
 25 1 5 10 15

 Ala Val Gly Pro Gln Asn Ala Met Leu Leu Lys Tyr Gly Ile Arg Arg
 30 20 25 30

 Asp His Ile Gly Leu Ile Ile Val Val Cys Ala Leu Ser Asp Val Ile
 35 35 40 45

 35 Leu Ile Thr Ser Gly Thr Ala Gly Val Gly Tyr Leu Val Glu Lys Phe
 50 55 60

 40 Pro Asn Ala Leu Gln Val Leu Lys Tyr Val Gly Ala Ala Tyr Leu Ala
 65 70 75 80

 Tyr Phe Thr Phe Thr Cys Phe Arg Asp Ala Phe Lys Thr Lys Gly Glu
 45 85 90 95

 Ala Ile Glu Val Glu Ser Thr Gln Pro Lys Ala Pro Gln Glu Val Ala
 50 100 105 110

 Ser Phe Asp Gly Ser Gln Ala Arg Ser Thr Thr Lys Thr Ala Ala Arg
 55 115 120 125

 Val Glu Ile Lys Arg Ser Pro Ser Trp Val Lys Pro Leu Leu Thr Ala
 130 135 140

 60 Leu Ala Leu Thr Trp Leu Asn Pro Gly Ala Tyr Val Asp Val Val Val
 145 150 155 160

Met Leu Gly Ser Ile Ala Asn Gln Tyr Gly Glu Ser Gly Arg Trp Leu
165 170 175

5 Phe Ala Val Gly Ala Ile Cys Ala Ser Phe Thr Trp Phe Pro Phe Ile
180 185 190

10 Gly Phe Gly Ala Ala Arg Phe Ser His Val Leu Ser Arg Pro Thr Val
195 200 205

15 Trp Arg Trp Ile Asn Phe Gly Ile Gly Val Ile Met Ile Gly Leu Thr
210 215 220

Leu Lys Leu Leu Leu Leu
225 230

20 <210> 15
<211> 241
<212> PRT
<213> Corynebacterium accolens ATCC49725

25 <220>
<221> LysE
<222> (1)..(241)

30 <400> 15

35 Met Ser Ile Val Leu Ala Gly Phe Val Leu Gly Leu Ser Leu Ile Val
1 5 10 15

Ala Val Gly Pro Gln Asn Ala Met Leu Leu Lys Tyr Gly Ile Arg Arg
20 25 30

40 Asp His Ile Gly Leu Ile Ile Val Val Cys Ala Leu Ser Asp Val Ile
35 40 45

45 Leu Ile Thr Ser Gly Thr Ala Gly Val Gly Tyr Leu Val Glu Arg Phe
50 55 60

50 Pro Asn Ala Leu Glu Ala Leu Lys Tyr Ile Gly Ala Ala Tyr Leu Ala
65 70 75 80

55 Phe Phe Thr Phe Thr Cys Phe Arg Asp Ala Phe Lys Thr Lys Gly Glu
85 90 95

Ala Ile Asp Val Glu Ser Thr Ser Pro Asn Ser Thr Glu Glu Val Ala
100 105 110

60 Thr Phe Asp Gly Asp Gly Asp Ser Thr Gly Gly Val Gly Thr Glu His
115 120 125

Gly Ser Val Ala Thr Ala Thr Ala Thr Gln Arg Gln Glu Ile Lys Arg
 130 135 140

5

Ser Pro Ser Trp Val Lys Pro Leu Leu Thr Ala Leu Ala Leu Thr Trp
 145 150 155 160

10

Leu Asn Pro Gly Ala Tyr Val Asp Val Leu Val Met Leu Gly Gly Ile
 165 170 175

15

Ala Asn Gln Tyr Gly Asp Pro Gly Arg Trp Leu Phe Ala Gly Gly Ala
 180 185 190

20

Ile Ala Ala Ser Phe Thr Trp Phe Pro Val Ile Gly Phe Gly Ala Ala
 195 200 205

25

Arg Phe Ser His Val Leu Ser Arg Pro Glu Val Trp Arg Trp Ile Asn
 210 215 220

30

Val Gly Ile Gly Val Ile Met Ile Gly Leu Thr Leu Lys Leu Leu Leu
 225 230 235 240

35

<210> 16
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glucuronalyticum ATCC51867

40

Met Val Pro Glu Asn Leu Ser Phe Tyr Leu Cys Val Leu Leu Thr His
 1 5 10 15

45

Asn Lys Tyr Val Asn Val Phe Phe Ala Gly Leu Leu Phe Asn Leu Ser
 20 25 30

50

Leu Ile Leu Ala Leu Gly Pro Gln Asn Ala Leu Ile Leu Lys Tyr Gly
 35 40 45

55

Leu Arg Arg Gln Ala Ile Thr Leu Val Ile Ser Val Cys Ala Leu Cys
 50 55 60

60

Asp Ile Thr Leu Ile Ala Leu Ser Gly Val Gly Val Gly Val Ile Leu
 65 70 75 80

Gln Lys Ala Pro Ile Val Leu Glu Ile Leu Arg Tyr Ala Gly Phe Leu
 85 90 95

Tyr Leu Leu Trp Phe Ala Tyr Thr Cys Phe Arg Asp Ala Ile His Pro
 100 105 110
 5
 Lys Thr Leu Ala Thr Glu Thr Val Ser Glu Thr Lys Pro His Glu Glu
 115 120 125
 10
 Glu Leu Pro Asp Val Ser Ser Thr Thr Ala Gly Thr Thr Met Ala Thr
 130 135 140
 15
 Ala Thr Val Met Glu Thr Ala Thr Thr Val Lys Glu Lys Thr His Arg
 145 150 155 160
 20
 Arg Thr Phe His Ile Pro Gln Glu Ile Lys Gly Pro Ala Val Ala Ala
 165 170 175
 Phe Val Val Ser Val Ile Asn Pro Ala Ala Trp Val Asp Leu Phe Val
 180 185 190
 25
 Val Ile Gly Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Gly Pro Asp Lys Trp Ala Phe
 195 200 205
 30
 Leu Leu Gly Thr Met Ala Ala Ser Leu Val Trp Phe Pro Ala Phe Gly
 210 215 220
 35
 Tyr Gly Ala Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu Ser Ser Pro Lys Val Trp
 225 230 235 240
 40
 Arg Cys Ile Asn Thr Gly Ile Gly Leu Phe Met Val Phe Met Ala Phe
 245 250 255
 Arg Val Leu Phe Met
 260
 45
 <210> 17
 <211> 204
 <212> PRT
 <213> Micrococcus luteus NCTC2665
 50
 <400> 17
 Met Trp Thr Leu Ala Gly Thr Gly Leu Leu Thr Gly Leu Ala Leu Ile
 1 5 10 15
 55
 Val Ala Ile Gly Ala Gln Asn Ala Phe Val Leu Arg Gln Gly Val Arg
 20 25 30
 60
 Arg Glu His Val Gly Ala Val Val Leu Val Cys Met Ala Ser Asp Ala
 35 40 45

Val Leu Ile Leu Ala Gly Thr Ala Gly Val Gly Ala Leu Val Gln Ala
 50 55 60
 5
 Val Pro Trp Leu Leu Glu Val Leu Arg Trp Gly Gly Ala Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 10 Leu Trp Phe Ala Val Ser Ser Leu Arg Ala Ala Leu Arg Pro Gln Gly
 85 90 95
 15 Leu Met Ala Glu Gln Ala Pro Arg Thr Ala Gly Ser Val Ile Ala Thr
 100 105 110
 20 Thr Leu Ala Leu Thr Trp Leu Asn Pro His Val Tyr Leu Asp Thr Val
 115 120 125
 Val Leu Leu Gly Ser Leu Ala Asn Gln His Gly Pro Asp Ala Arg Trp
 130 135 140
 25 Val Phe Ala Ala Gly Ala Val Ala Ala Ser Val Leu Trp Phe Thr Ala
 145 150 155 160
 30 Leu Gly Tyr Gly Ala Arg Leu Leu Ala Arg Val Leu Ala Asp Pro Lys
 165 170 175
 35 Ala Trp Arg Val Val Asp Val Val Ile Ala Val Val Met Ala Val Leu
 180 185 190
 40 Ala Val Arg Leu Ile Ala Gly Ser Asp Val Trp Gly
 195 200
 <210> 18
 <211> 230
 <212> PRT
 45 <213> Corynebacterium tuberculostearicum SK141
 <220>
 <221> ArgO(LysE)
 50 <222> (1)..(230)
 <400> 18
 55 Met Ser Ile Val Leu Ala Gly Phe Phe Leu Gly Leu Ser Leu Ile Val
 1 5 10 15
 Ala Val Gly Pro Gln Asn Ala Met Leu Leu Lys Tyr Gly Ile Arg Arg
 20 25 30
 60 Asp His Ile Gly Leu Ile Ile Val Val Cys Ala Leu Ser Asp Val Ile
 35 40 45

Leu Ile Thr Ser Gly Thr Ala Gly Val Gly Tyr Leu Val Glu Lys Phe
50 55 60

5

Pro Asn Ala Leu Gln Val Leu Lys Tyr Val Gly Ala Ala Tyr Leu Ala
65 70 75 80

10

Tyr Phe Thr Phe Thr Cys Phe Arg Asp Ala Leu Lys Thr Lys Gly Glu
85 90 95

15

Ala Ile Glu Val Glu Ser Thr Gln Pro Lys Val Pro Gln Glu Val Ala
100 105 110

20

Ser Phe Asp Gly Ser Gln Ala Arg Asn Thr Thr Lys Thr Ala Thr Arg
115 120 125

25

Val Glu Ile Lys Arg Ser Pro Ser Trp Val Lys Pro Leu Leu Thr Ala
130 135 140

30

Leu Ala Leu Thr Trp Leu Asn Pro Gly Ala Tyr Val Asp Val Val Val
145 150 155 160

35

Met Leu Gly Ser Ile Ala Asn Gln Tyr Gly Glu Ser Gly Arg Trp Leu
165 170 175

40

Phe Ala Val Gly Ala Ile Cys Ala Ser Phe Thr Trp Phe Pro Phe Ile
180 185 190

45

Gly Phe Gly Ala Ala Arg Phe Ser His Val Leu Ser Arg Pro Thr Val
195 200 205

50

Trp Arg Trp Ile Asn Phe Gly Ile Gly Val Ile Met Ile Gly Leu Thr
210 215 220

55

Leu Lys Leu Leu Leu Leu
225 230

<210> 19
<211> 244
<212> PRT
<213> Corynebacterium matruchotii ATCC14266

60

<220>
<221> ArgO(LysE)
<222> (1)..(244)

<400> 19

Met Ser Ile Ala Val Ala Gly Phe Leu Leu Gly Leu Ser Leu Ile Val

	1		5		10		15									
5	Ala	Ile	Gly	Pro	Gln	Asn	Ala	Leu	Val	Ile	Arg	Gln	Gly	Val	Lys	Arg
			20					25					30			
10	Glu	Gly	Leu	Ile	Val	Val	Leu	Ala	Ile	Cys	Met	Leu	Ser	Asp	Ile	Phe
			35				40						45			
15	Leu	Ile	Phe	Gly	Gly	Thr	Ala	Gly	Val	Gly	Val	Ile	Ile	Glu	Lys	Ala
		50					55					60				
20	Pro	Leu	Ala	Leu	Val	Ala	Leu	Lys	Trp	Phe	Gly	Ala	Ala	Tyr	Leu	Ala
	65					70					75				80	
25	Trp	Phe	Ala	Val	Ser	Cys	Phe	Lys	Asp	Met	Val	Lys	Pro	Arg	Ala	Leu
					85					90					95	
30	Asp	Ser	Ser	Ala	Thr	Asp	Asn	Gly	Thr	Ser	Leu	Asp	Asp	Ala	Pro	Thr
			100					105						110		
35	Val	Ala	His	Ile	Ser	Asn	Val	Asp	Ser	Thr	Ser	Gly	Asn	Gly	Gly	Gln
			115					120					125			
40	Val	Gln	Thr	Lys	Thr	Arg	Pro	Ile	Thr	Thr	Thr	Ala	Pro	Thr	Arg	Gln
		130					135					140				
45	Ala	His	Pro	Ala	Arg	Pro	Trp	Val	Lys	Pro	Ala	Leu	Ala	Ala	Leu	Ala
	145					150					155				160	
50	Phe	Thr	Trp	Leu	Asn	Pro	Ser	Ala	Tyr	Ile	Asp	Thr	Leu	Val	Met	Leu
					165					170					175	
55	Gly	Gly	Ile	Ala	Asn	Gln	His	Gly	Glu	Ser	Gly	Arg	Trp	Val	Phe	Ala
				180					185					190		
60	Ala	Gly	Ala	Leu	Met	Ala	Ser	Ala	Val	Trp	Phe	Pro	Leu	Leu	Gly	Phe
			195					200					205			
65	Phe	Ser	Thr	Arg	Phe	Ser	Arg	Val	Leu	Ser	Arg	Pro	Gln	Ala	Trp	Arg
		210					215					220				
70	Val	Ile	Asn	Gly	Val	Ile	Gly	Cys	Ile	Met	Val	Val	Met	Cys	Ile	Arg
	225					230					235				240	
75	Leu	Ile	Met	His												

<210> 20
 <211> 864
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

5

<220>
 <221> lysE
 <222> (76)..(777)
 <223> pVWEx1- Insert

10

<400> 20
 tgagcggata acaatttcac acaggaaaca gaattaaaag atatgaccat gattacgcc 60
 15 agcttgcattg ccatcatgga aatcttcatt acaggtctgc ttttgggggc cagtctttta 120
 ctgtccatcg gaccgcagaa tgtactggtg attaaacaag gaattaagcg cgaaggactc 180
 attgcggttc ttctcgtgtg ttttaatttct gacgtctttt tgttcatcgc cggcaccttg 240
 20 ggcggtgatc ttttgtccaa tgccgcgcgc atcgtgctcg atattatgcg ctgggggtggc 300
 atcgcttacc tgttatggtt tgccgtcatg gcagcgaaag acgccatgac aaacaagggtg 360
 25 gaagcgccac agatcattga agaaacagaa ccaaccgtgc ccgatgacac gcctttgggc 420
 ggttcggcgcg tggccactga cacgcgcaac cgggtgcggg tggaggtgag cgtcgataag 480
 cagcggggttt gggtaaagcc catgttgatg gcaatcgtgc tgacctgggt gaacccgaat 540
 30 gcgtatttgg acgcgtttgt gtttatcggc ggcgctcggc cgcaatacgg cgacaccgga 600
 cgggtggattt tcgccgctgg cgcgttcgcg gcaagcctga tctggttccc gctggtgggt 660
 35 ttccgcgag cagcattgtc acgcccgtg tccagcccca aggtgtggcg ctggatcaac 720
 gtcgtcgtgg cagttgtgat gaccgcattg gccatcaaac tgatgttgat gggttagttt 780
 tcgcggggttt tggaatcggg ggccttcgcc caaatattga cctagaggat ccccggttac 840
 40 cgagctcgaa ttcaactggc gtcg 864

<210> 21
 <211> 1036
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

45

<220>
 <221> 'argD
 <222> (15)..(491)
 <223> 3'-Ende des argD-Gens

50

<220>
 <221> argF'
 <222> (505)..(523)
 <223> 5'-Ende des argF-Gens

55

<220>
 <221> 'argH
 <222> (524)..(538)
 <223> 3'-Ende des argH-Gens

60

<220>
 <221> cg1589'
 <222> (605)..(1024)
 5 <223> 5'-Ende des cg1589-Leserasters

 <400> 21
 ggtggtgcta gcccggcgat ttctttgcac atcagcacga tggcgttggt cccgatgtgg 60
 10 tgaccatggc caagggactt ggcggcggtc ttcccatcgg tgcttgtttg gccactggcc 120
 gtgcagctga attgatgacc ccaggcaagc acggcaccac ttctgggtggc aaccagttg 180
 15 cttgtgcagc tgccaaggca gtgctgtctg ttgtcgatga cgctttctgc gcagaagttg 240
 cccgcaaggg cgagctgttc aaggaacttc ttgccaaggt tgacggcgtt gtagacgtcc 300
 gtggcagggg cttgatgttg ggcgtggtgc tggagcgcga cgtcgcaaag caagctgttc 360
 20 ttgatggttt taagcacggc gttattttga atgcaccggc ggacaacatt atccgtttga 420
 ccccgccgct ggtgatcacc gacgaagaaa tcgcagacgc agtcaaggct attgccgaga 480
 caatcgcata aaggactcaa acttatgact tcacaaccac aggggggtac gtcgataagc 540
 25 attagtttat ggctgtgct gctttccgat tgcgggagtt gcacaggcca tttattatca 600
 attcatgaat ggttcccctg attactcaag aaaatctcga ggcaggggat tttccgtatt 660
 30 tttaggcatc atcctgctgg tcatcgcggt attagcggtc ttggtgggccc gcggaaccat 720
 cgccatgcca aagctcttcg gatcaagtaa cttgaccgag gtcagagcag taattggctc 780
 35 ggaaaagaag gaattcttcg aagatccaga agtcgttgaa gccttcgccg accacggctt 840
 tgaagttaac gtggacaccg caggatctcg tcggatcgcc actgatgtgg acttgagccc 900
 gtacgatttc gcgttcccat cctctgcacc agctgcgcag aagatctccg aagccaacac 960
 40 cacgacgggc cgattcacc cttctattc gcctatggcg gtagcaacat tcggaaccat 1020
 caccatgcat accacc 1036

 45 <210> 22
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Oligonucleotit

 50
 <220>
 <221> lysE_1.p
 <222> (1)..(28)

 55 <400> 22
 tcgatatcat ggaaatcttc attacagg 28

 60 <210> 23
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Oligonucleotit

<220>
 <221> lysE_2.p
 <222> (1)..(32)
 5
 <400> 23
 tgcctagggtc aatatttggg cgaaggccac cg 32

10 <210> 24
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Oligonucleotit

15
 <220>
 <221> argFRGH_d1
 <222> (1)..(32)

20 <400> 24
 ggtggtgcta gcccggcgat ttctttgcac at 32

25 <210> 25
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Oligonucleotit

30 <220>
 <221> argFRGH_d2
 <222> (1)..(40)

35 <400> 25
 aatgcttatc gacgtacccc cctgtggttg tgaagtcata 40

40 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Oligonucleotit

45 <220>
 <221> argFRGH_d3
 <222> (1)..(20)

50 <400> 26
 ggggtacgtc gataagcatt 20

55 <210> 27
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Oligonucleotit

60 <220>
 <221> argFRGH_d4
 <222> (1)..(32)

<400> 27
 ggtggtatgc atggtgatgg ttccgaatgt tg 32

<210> 28
 <211> 238
 5 <212> ADN
 <213> PgapRBS *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

<220>
 10 <221> RBS
 <222> (225)..(232)

<400> 28
 15 ctgtatgatt ttgcatctgc tgcgaaatct ttgtttcccc gctaaagttg aggacaggtt 60
 gacacggagt tgactcgacg aattatccaa tgtgagtagg tttggtgctg gagttggaaa 120
 aattcgccat actcgccctt gggttctgtc agctcaagaa ttcttgagt accgatgctc 180
 20 tgattgacct aactgcttga cacattgcat ttcttacaat ctttagagga gacacaac 238

<210> 29
 <211> 8281
 25 <212> ADN
 <213> pEC7lysE

<400> 29
 30 tcccagaggc agcgtcggcg gctcctgcct ccccgcccg gcgccgaccg ggaccgcgaa 60
 accccttgat ccgctgtcgg gggtgatcct gcaagcctcg tcgtcctggc cggaccacgc 120
 tatctgtgca aggtcccccg ccccgacgc gcgctccatg agcagagcgc ccgccgggga 180
 35 tcgatccggg cttatcgact gcacggtgca ccaatgcttc tggcgtcagg cagccatcgg 240
 aagctgtggt atggctgtgc aggtcgtaaa tcaactgcata attcgtgtcg ctcaaggcgc 300
 actcccgttc tggataatgt tttttgcgc gacatcataa cggttctggc aaatattctg 360
 40 aaatgagctg ttgacaatta atcatcggt cgtataatgt gtggaattgt gagcggataa 420
 caatttcaca caggaaacag aattcccagc ttgagtagga caaatccgc gagcttcgac 480
 45 gagattttca ggagctaagg aagctaaaat ggagaaaaaa atcaactggat ataccaccgt 540
 tgatatatcc caatggcatc gtaaagaaca ttttgaggca tttcagtcag ttgctcaatg 600
 tacctataac cagacogttc agctggatat tacggccttt ttaaagaccg taaagaaaaa 660
 50 taagcacaag ttttatccgg cttttattca cattcttgcc cgctgatga atgctcatcc 720
 ggaattccgt atggcaatga aagacggtga gctggtgata tgggatagtg ttcacccttg 780
 55 ttacaccgtt ttccatgagc aaactgaaac gttttcatcg ctctggagtg aataccacga 840
 cgatttcggg cagtttctac acatatattc gcaagatgtg gcgtgttac gtgaaaacct 900
 ggcctatttc cctaaagggt ttattgagaa tatgtttttc gtctcagcca atocctgggt 960
 60 gagtttcacc agttttgatt taaacgtggc caatatggac aacttcttcg ccccggtttt 1020
 caccatgggc aaatattata cgcaaggcga caagggtgctg atgccgctgg cgattcaggt 1080

	tcacatgcc	gtttgtgatg	gcttccatgt	cggcagaatg	cttaatgaat	tacaacagta	1140
5	ctgcgatgag	tggcagggcg	gggcgtaatt	tttttaaggc	agttattggg	gcccttaaag	1200
	gcctgggtgc	tacgcctgaa	taagtataaa	taagcggatg	aatggcagaa	attcgctcag	1260
	gcggcacctc	gctaacggat	tcaccactcc	aagaattgga	gccaatcaat	tcttgccggag	1320
10	aactgtgaat	gcgcaaacca	acccttggca	gaacatatcc	atcgcgcccg	ccatctccag	1380
	cagccgcacg	cggcgcatct	cggctgtttt	ggcggatgag	agaagatttt	cagcctgata	1440
15	cagattaaat	cagaacgcag	aagcggctcg	ataaaacaga	atttgccctgg	cggcagtagc	1500
	gcgggtggcc	cacctgaccc	catgccgaac	tcagaagtga	aacgccgtag	cgcgatggg	1560
	agtgtggggg	ctcccatgc	gagagtaggg	aactgccagg	catcaaataa	aacgaaaggg	1620
20	tcagtcgaaa	gactgggcct	ttcgttttat	ctgttgtttg	tcggtgaacg	ctctcctgag	1680
	taggacaaat	ccgccgggag	cggatttgaa	cgttgcggaag	caacggcccg	gaggggtggcg	1740
25	ggcaggacgc	ccgccataaa	ctgccaggca	tcaaattaag	cagaaggcca	tcctgacgga	1800
	tggccttttt	gcgtttctac	aaactcttcc	tgctgctcata	tctacaagcc	atccccccac	1860
	agatacggta	aactagcctc	gtttttgcat	caggaaagca	gaattcgtaa	tcatgtcata	1920
30	gctgtttcct	gtgtgaaatt	gttatccgct	cacaattcca	cacaacatac	gagccggaag	1980
	cataaagtgt	aaagcctggg	gtgcctaata	agtgagctaa	ctcacattaa	ttgcgttgcg	2040
35	ctcactgccc	gctttccagt	cgggaaacct	gtcgtgccag	ctgcattaat	gaatcggcca	2100
	acgcgcgggg	agaggcggtt	tgcgtattgg	gcgctcttcc	gcttcctcgc	tcactgactc	2160
	gctgcgctcg	gtcgcttcgg	tgccgcgagc	ggtatcagct	cactcaaagg	cggtaatacg	2220
40	gttatccaca	gaatcagggg	ataacgcagg	aaagaacatg	tgagcaaaaag	gccagcaaaa	2280
	ggccaggaac	cgtaaaaagg	ccgcgttgct	ggcgtttttc	cataggctcc	gccccctga	2340
45	cgagcatcac	aaaaatcgac	gctcaagtca	gaggtggcga	aacccgacag	gactataaag	2400
	ataccaggcg	tttccccctg	gaagctccct	cgtgcgctct	cctgttcoga	ccctgccgct	2460
	taccggatac	ctgtccgcct	ttctcccttc	gggaagcgtg	gcgctttctc	atagctcacg	2520
50	ctgtaggtat	ctcagttcgg	tgtaggtcgt	tcgctccaag	ctgggctgtg	tgacgaacc	2580
	ccccgttcag	cccgaccgct	gcgccttata	cggtaactat	cgtcttgagt	ccaaccgggt	2640
55	aagacacgac	ttatcgccac	tggcagcagc	cactggtaac	aggattagca	gagcgaggta	2700
	tgtaggcggt	gctacagagt	tcttgaagtg	gtggcctaac	tacggctaca	ctagaagaac	2760
	agtatttggt	atctgcgctc	tgctgaagcc	agttaccttc	ggaaaaagag	ttggtagctc	2820
60	ttgatccggc	aaacaaacca	ccgctggtag	cgggtggtttt	tttgtttgca	agcagcagat	2880
	tacgcgcaga	aaaaaaggat	ctcaagaaga	tcctttgatc	ttttctacgg	ggtctgacgc	2940

	tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt	3000
	cacctagatc cttttggggg gggggggaaa gccacgttgt gtctcaaaat ctctgatgtt	3060
5	acattgcaca agataaaaat atatcatcat gaacaataaa actgtctgct tacataaaca	3120
	gtaataacaag ggggtgttatg agccatattc aacgggaaac gtcttgctcg aagccgcct	3180
10	aatgagcggg ctttttttta aaaaaagcc cgctcattag gcgggctagc ccgcctaata	3240
	agcgggcttt ttttttcgag gccgcgatta aattccaaca tggatgctga tttatatggg	3300
	tataaatggg ctcgaaaaga tatgaccatg attacgcaa gcttgcatgc ctgcaggctg	3360
15	actctagagg atccaccgtg accagtgcac tgattggtgc ttcgtcagtt gagcagctgg	3420
	acaacagcct tgattcactc aacaacttgg agttttctga cgccgagttg gaggcgatcg	3480
20	atgagatttc ccacgacgcc ggcacaaaca tttgggcgaa ggccaccgat tccaaaaccc	3540
	gcgaaaacta acccatcaac atcagtttga tggccaatgc ggtcatcaca actgccacga	3600
	cgacgttgat ccagcgccac accttggggc tggacagcgg gcgtgacaat gctgctgcgc	3660
25	cgaaaccac cagcgggaac cagatcaggc ttgcgcgaa cgcgccagcg gcgaaaatcc	3720
	accgtccggg gtcgccttat tgcgcgccga cgccgccgat aaacacaaac gcgtccaaat	3780
30	acgcattcgg gttcaaccag gtcagcacga ttgccatcaa catgggcttt acccaaaccc	3840
	gctgcttata gacgctcacc tccacccgca cccggttgcg cgtgtcagtg gccaccgccg	3900
	aaccgccccaa aggcgtgtca tcgggcacgg ttggttctgt ttcttcaatg atctgtggcg	3960
35	cttcacactt gtttgtcatg gcgtctttcg ctgccatgac ggcaaaccat aacaggtaag	4020
	cgatgccacc ccagcgcata atatcgagca cgatcgccgc ggcattggac aaaagatcaa	4080
40	cgcccaaggt gccggcgatg aacaaaaaga cgtcagaaat taaacacacg agaagaaccg	4140
	caatgagtcc ttcgcgctta attccttgtt taatcaccag tacattctgc ggtccgatgg	4200
	acagtaaaag actggcccc aaagcagac ctgtaatgaa gatttccatg atcaccatcg	4260
45	tgacctatgg aagtacttaa gtaaaatgat tggttcttaa catggtttaa tatagcttca	4320
	tgaaccccat tcaactggac actttgctct caatcattga tgaaggcagc ttcgaaggcg	4380
50	cctccttagc cctttccatt tccccctcg cggtgagtca gcgcggatcc ccgggtaccg	4440
	agctcgaatt cactggccgt cgttttaccg ataatgtcgg gcaatcaggt gcgacaatct	4500
	atcgagcttt tgccattctc accggattca gtcgtcactc atggtgattt ctcaattgat	4560
55	aaccttattt ttgacgaggg gaaattaata gggtgtattg atgttgagc agtcggaatc	4620
	gcagaccgat accaggatct tgccatccta tggaactgcc tcggtgagtt ttctccttca	4680
60	ttacagaaac ggctttttca aaaatatggt attgataatc ctgatatgaa taaattgcag	4740
	tttcatttga tgctcgatga gtttttctaa tcagaattgg ttaattggtt gtaacactgg	4800
	cagagcatta cgctgacttg acgggacggc ggctttgttg aataaatcga acttttgctg	4860

	agttgaagga tcagatcacg catcttccccg acaacgcaga ccgttccgtg gcaaagcaaaa	4920
5	agttcaaaaat caccaactgg tccacctaca acaaagctct catcaaccgt ggctccctca	4980
	ctttctggct ggatgatggg gcgattcagg cctgggtatga gtcagcaaca ctttcttcac	5040
	gaggcagacc tcagcgcccc ccccccccta gcttgtctac gtctgatget ttgaatcgga	5100
10	cggacttgcc gatcttgtat gcggtgattt ttccctcggt tgcccacttt ttaatggtgg	5160
	ccggggtgag agctacgcgg gcggcgacct gctgcgctgt gatccaatat tcggggtcgt	5220
15	tcactgggtc ccctttctga tttctggcat agaagaacct ccgtgaactg tgtgggtccg	5280
	gggggttgctg atttttgcga gacttctcgc gcaattccct agcttaggtg aaaacaccat	5340
	gaaacactag ggaaacaccc atgaaacacc cattagggca gtagggcggc ttcttcgtct	5400
20	agggcttgca tttgggcggg gatctggtct ttagcgtgtg aaagtgtgtc gtaggtggcg	5460
	tgctcaatgc actcgaacgt cacgtcattt accgggtcac ggtgggcaaa gagaactagt	5520
25	gggtagaca ttgttttctt cgttgctcggg ggtggtgagc ttttctagcc gctcggtaaa	5580
	cgcggcgatc atgaactctt ggagggtttt accgttctgc atgcctgcgc gcttcatgtc	5640
	ctcacgtagt gcaaaggaa cgcgtgcggg gaccacgacg ggcttagcct ttgcctgcgc	5700
30	ttctagtgtc tcgatgggtg cttgtgcctg cgcttgctgc gcctgtagtg cctgttgagc	5760
	ttcttgtagt tgctgttcta gctgtgcctt ggttgccatg ctttaagact ctagtagctt	5820
35	tcctgcgata tgtcatgcgc atgcgtagca aacattgtcc tgcaactcat tcattatgtg	5880
	cagtgtcctt gttactagtc gtacatactc atatttacct agtctgcatg cagtgcagtc	5940
	acatgcagtc atgtcgtgct aatgtgtaaa acatgtacat gcagattgct ggggggtgcag	6000
40	ggggcggagc caccctgtcc atgcgggggtg tggggcttgc cccgccggta cagacagtga	6060
	gcaccggggc acctagtcgc ggataccccc cctaggtatc ggacacgtaa ccctcccatg	6120
45	tcgatgcaaa tctttaacat tgagtacggg taagctggca cgcatagcca agctaggcgg	6180
	ccaccaaaaa cactaaaaa ttaatagttc ctagacaaga caaaccctcg tgcgagctac	6240
	caactcatat gcacgggggc cacataacct gaaggggttt caattgacaa ccatagcact	6300
50	agctaagaca acgggcacaa caccgcaca aactcgcact gcgcaacccc gcacaacatc	6360
	gggtctaggt aacactgaaa tagaagtga cactctaag gaaccgcagg tcaatgaggg	6420
55	ttctaaggtc actcgcgcta gggcgtggcg taggcaaaac gtcatgtaca agatcaccaa	6480
	tagtaaggct ctggcggggt gccataggtg gcgcagggac gaagctgttg cgggtgcctg	6540
	gtcgtctaac ggtgcttcgc agtttgaggg tctgcaaaac tctcactctc gctgggggtc	6600
60	acctctggct gaattggaag tcatgggcga acgcgcatt gagctggcta ttgctactaa	6660
	gaatcacttg gcggcggggt gcgcgctcat gatgtttgtg ggcactgttc gacacaaccg	6720

	ctcacagtca tttgcgcagg ttgaagcggg tattaagact gcgtactctt cgatggtgaa	6780
	aacatctcag tggaagaaag aacgtgcacg gtacggggtg gagcacacct atagtgacta	6840
5	tgaggtcaca gactcttggg cgaacggttg gcacttgac cgcaacatgc tgttgttctt	6900
	ggatcgcca ctgtctgacg atgaactcaa ggcgtttgag gattccatgt tttcccgctg	6960
10	gtctgctggg gtggttaagg ccggtatgga cgcgccactg cgtgagcacg ggggtcaaact	7020
	tgatcagggtg tctacctggg gtggagacgc tgcgaaaatg gcaacctacc togctaaggg	7080
	catgtctcag gaactgactg gctccgctac taaaaccgcg tctaaggggt cgtacacgcc	7140
15	gtttcagatg ttggatatgt tggccgatca aagcgacgcc ggcgaggata tggacgctgt	7200
	tttgggtggc cggtggcgtg agtatgaggt tggttctaaa aacctgcgtt cgtcctggtc	7260
20	acgtggggct aagcgtgctt tgggcattga ttacatagac gctgatgtac gtcgtgaaat	7320
	ggaagaagaa ctgtacaagc tcgccggtct ggaagcaccg gaacgggtcg aatcaaccgc	7380
	cgttgctgtt gctttggtga agcccgatga ttggaaactg attcagtctg atttcgcggt	7440
25	taggcagtac gttctagatt gcgtggataa ggctaaggac gtggccgctg cgcaacgtgt	7500
	cgctaatagag gtgctggcaa gtctgggtgt ggattccacc ccgtgcatga tcgttatgga	7560
30	tgatgtggac ttggacgcgg ttctgcctac tcatggggac gctactaagc gtgatctgaa	7620
	tgccggcgtg ttcgcgggta atgagcagac tattcttcgc acccactaaa agcggcataa	7680
	accccgttcg atattttgtg cgatgaattt atggtcaatg tcgcgggggc aaactatgat	7740
35	gggtcttgtt gttgacaatg gctgatttca tcaggaatgg aactgtcatg ctgttatgtg	7800
	cctggctcct aatcaaagct ggggacaatg ggttgccccg ttgatctgat ctagtccgga	7860
40	ttggcggggc ttcactgtat ctgggggtgg catcgtgaat agattgcaca ccgtagtggg	7920
	cagtgtgcac accatagtgg ccatgagcac caccaccccc agggacgccg acggcgcgaa	7980
	gctctgcgcc tgggtgcggc cgagatcaa gcaatccggc gtcggccgga gccgggacta	8040
45	ctgccgccgc tcctgccgcc agcgggcgta cgaggccccg cgccagcgcg aggcgatcgt	8100
	gtccgccgtg gcgtcggcag tcgctcggcg agatacgtca cgtgacgaaa tgcagcagcc	8160
50	ttccattccg tcacgtgacg aaactcgggc cgcaggtcag agcacggttc cgcccgtcc	8220
	ggccctgccg gacccccggc tgcagctcgc ccggccgccg gtccccctgc cgtccggccc	8280
	g	8281
55		
	<210> 30	
	<211> 290	
	<212> PRT	
	<213> Corynebacterium glutamicum ATCC13032	
60		
	<220>	
	<221> dấu hiệu misc	

<222> (1)..(290)

<223> Aminosäuresequenz des Aktivatorproteins LysG von Corynebacterium glutamicum ATCC13032

5 <400> 30

Met Asn Pro Ile Gln Leu Asp Thr Leu Leu Ser Ile Ile Asp Glu Gly
1 5 10 15

10 Ser Phe Glu Gly Ala Ser Leu Ala Leu Ser Ile Ser Pro Ser Ala Val
20 25 30

15 Ser Gln Arg Val Lys Ala Leu Glu His His Val Gly Arg Val Leu Val
35 40 45

20 Ser Arg Thr Gln Pro Ala Lys Ala Thr Glu Ala Gly Glu Val Leu Val
50 55 60

25 Gln Ala Ala Arg Lys Met Val Leu Leu Gln Ala Glu Thr Lys Ala Gln
65 70 75 80

Leu Ser Gly Arg Leu Ala Glu Ile Pro Leu Thr Ile Ala Ile Asn Ala
85 90 95

30 Asp Ser Leu Ser Thr Trp Phe Pro Pro Val Phe Asn Glu Val Ala Ser
100 105 110

35 Trp Gly Gly Ala Thr Leu Thr Leu Arg Leu Glu Asp Glu Ala His Thr
115 120 125

40 Leu Ser Leu Leu Arg Arg Gly Asp Val Leu Gly Ala Val Thr Arg Glu
130 135 140

45 Ala Asn Pro Val Ala Gly Cys Glu Val Val Glu Leu Gly Thr Met Arg
145 150 155 160

His Leu Ala Ile Ala Thr Pro Ser Leu Arg Asp Ala Tyr Met Val Asp
165 170 175

50 Gly Lys Leu Asp Trp Ala Ala Met Pro Val Leu Arg Phe Gly Pro Lys
180 185 190

55 Asp Val Leu Gln Asp Arg Asp Leu Asp Gly Arg Val Asp Gly Pro Val
195 200 205

60 Gly Arg Arg Arg Val Ser Ile Val Pro Ser Ala Glu Gly Phe Gly Glu
210 215 220

Ala Ile Arg Arg Gly Leu Gly Trp Gly Leu Leu Pro Glu Thr Gln Ala

	225		230		235		240									
5	Ala	Pro	Met	Leu	Lys	Ala	Gly	Glu	Val	Ile	Leu	Leu	Asp	Glu	Ile	Pro
				245					250						255	
10	Ile	Asp	Thr	Pro	Met	Tyr	Trp	Gln	Arg	Trp	Arg	Leu	Glu	Ser	Arg	Ser
				260					265					270		
15	Leu	Ala	Arg	Leu	Thr	Asp	Ala	Val	Val	Asp	Ala	Ala	Ile	Glu	Gly	Leu
			275					280					285			
20	Arg	Pro														
		290														