(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) **1-0022884**

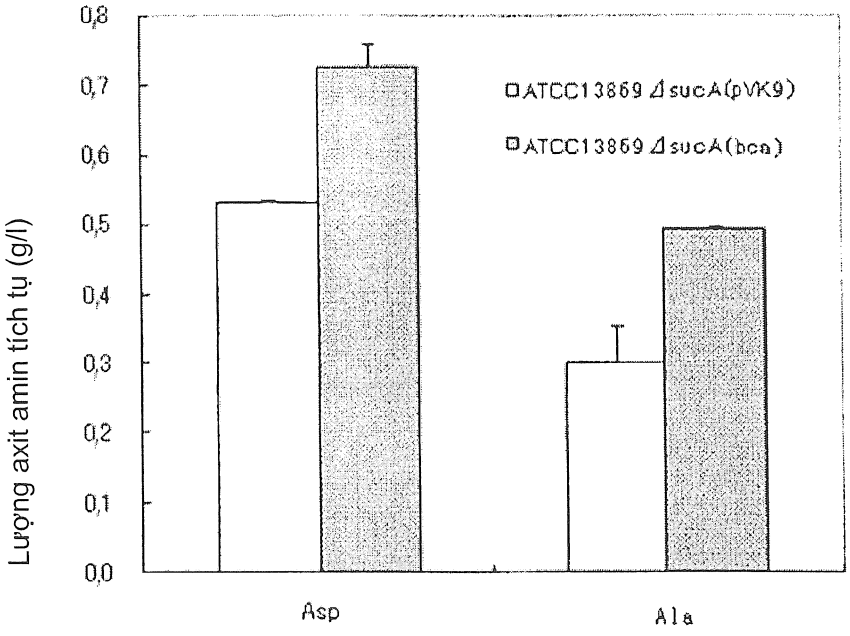
(51)[7] **C12P 13/04**, C12N 15/09

(13) **B**

(21) 1-2012-00396
(22) 21.07.2010
(86) PCT/JP2010/062253 21.07.2010
(87) WO2011/024583A1 03.03.2011
(30) 2009-194636 25.08.2009 JP
(45) 27.01.2020 382
(43) 25.06.2012 291
(73) AJINOMOTO CO., INC. (JP)
15-1, Kyobashi 1-chome, Chuo-ku, Tokyo 104-8315 Japan
(72) NAGAHIKO, Takeshi (JP), NAKAMURA, Jun (JP)
(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT AXIT AMIN DẠNG L

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất axit amin dạng L bao gồm bước nuôi cấy vi khuẩn Coryneform có khả năng sản sinh axit amin dạng L trong môi trường để sản sinh và tích tụ axit amin dạng L trong môi trường hoặc trong các tế bào vi khuẩn, và thu gom axit amin dạng L từ môi trường hoặc các tế bào, trong đó vi khuẩn Coryneform đã nêu đã được cải biến để gia tăng hoạt tính của cacbonic anhydraza.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất một cách hữu hiệu axit amin dạng L như axit L-glutamic, L-glutamin, L-prolin, L-arginin, L-asparagin, axit L-aspartic, L-lysin, L-methionin, L-threonin và L-isoleuxin bằng cách lên men.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các axit amin dạng L có thể được sản xuất theo phương pháp công nghiệp bằng cách lên men chủ yếu sử dụng vi khuẩn sản sinh axit amin dạng L gọi là vi khuẩn Coryneform thuộc chủng *Brevibacterium*, *Corynebacterium* hoặc *Microbacterium*, hoặc các chủng đột biến của chúng (ví dụ, xem tài liệu phi sáng chế 1). Như các phương pháp sản xuất axit amin dạng L bằng cách lên men sử dụng các chủng vi khuẩn khác, đã có các phương pháp đã biết sử dụng vi sinh vật thuộc chủng *Bacillus*, *Streptomyces*, *Penicillium* hoặc tương tự (ví dụ, xem tài liệu sáng chế 1), các phương pháp sử dụng vi sinh vật thuộc chủng *Pseudomonas, Arthrobacter, Serratia, Candida* hoặc tương tự (ví dụ, xem tài liệu sáng chế 2), các phương pháp sử dụng vi sinh vật thuộc chủng *Bacillus, Pseudomonas, hoặc Serratia*, *Aerobacter aerogenes* (hiện được gọi là *Enterobacter aerogenes*) hoặc tương tự (ví dụ, xem tài liệu sáng chế 3), các phương pháp sử dụng chủng đột biến *Escherichia coli* (ví dụ, xem tài liệu sáng chế 4), và v.v.. Ngoài ra, các phương pháp sản xuất axit amin dạng L sử dụng vi sinh vật thuộc chủng *Klebsiella, Erwinia*, *Pantoea* hoặc *Enterobacter* cũng đã được bộc lộ (ví dụ, xem các tài liệu sáng chế từ 5 đến 7).

Ngoài ra, cũng đã bộc lộ các kỹ thuật khác nhau để gia tăng khả năng sản sinh axit amin dạng L bằng cách tăng cường hoạt tính của enzym để sinh tổng hợp axit amin dạng L sử dụng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Ví dụ, đã biết rằng việc đưa gen mã hóa xitrat synthaza có nguồn gốc từ *Escherichia coli* hoặc *Corynebacterium glutamicum* vào vi khuẩn *Corynebacterium* hoặc *Brevibacterium* là hữu hiệu để gia tăng khả năng sản sinh axit L-glutamic của vi khuẩn Coryneform (ví dụ, xem tài liệu sáng chế 8). Hơn nữa, cũng đã có báo cáo là việc đưa gen xitrat synthaza có nguồn gốc từ vi khuẩn Coryneform vào vi khuẩn Enterobacterium thuộc chủng *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Erwinia*

hoặc *Escherichia* là hữu hiệu để gia tăng khả năng sản sinh axit L-glutamic của vi khuẩn (ví dụ, xem tài liệu sáng chế 9).

Cacbonic anhydraza là một enzym tham gia vào quá trình chuyển hóa cacbon dioxit và gốc bicacbonat. Đã có báo cáo là *Escherichia coli* có hai loại cacbonic anhydraza, tức là, Can (cacbonic anhydraza 2) và CynT (cacbonic anhydraza 1) (các tài liệu phi sáng chế 2 và 3). Cũng rõ ràng là Can là cacbonic anhydraza loại β, và không thể thiếu cho sự phát triển của *Escherichia coli* dưới áp suất riêng phần của cacbon dioxit ở khí quyển bình thường. Can và CynT được mã hóa lần lượt bằng các gen *yadF* và *cynT*. Cũng đã biết rằng, trong *Corynebacterium glutamicum*, các cacbonic anhydraza loại β và γ đã được phát hiện, và loại β đóng vai trò chính (xem tài liệu phi sáng chế 4).

Như quá trình sản sinh các chất hữu ích sử dụng cacbonic anhydraza, đã biết việc sử dụng chung trong việc sản xuất rượu etylic từ nguyên liệu rau quả chứa lignoxenluloza cho bước xử lý sơ bộ nguyên liệu thô (xem tài liệu sáng chế 10). Ngoài ra, đã có báo cáo là, trong việc nghiên cứu sự gia tăng β-cacbonic anhydraza của vi khuẩn *Corynebacterium*, không gia tăng lượng lysin sinh ra (xem tài liệu phi sáng chế 4), và tính hiệu quả của việc gia tăng β-cacbonic anhydraza đến việc sản sinh chất và tương quan giữa hoạt tính của β-cacbonic anhydraza và năng suất của axit amin dạng L vẫn chưa được biết đến.

Tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế 1: Patent Mỹ số 3,220,929

Tài liệu sáng chế 2: Patent Mỹ số 3,563,857

Tài liệu sáng chế 3: Công bố đơn Nhật (KOKOKU) số 32-9393

Tài liệu sáng chế 4: Công bố đơn Nhật không xét nghiệm (KOKAI) số 5-244970

Tài liệu sáng chế 5: Công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 2000-106869

Tài liệu sáng chế 6: Công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 2000-189169

Tài liệu sáng chế 7: Công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 2000-189175

Tài liệu sáng chế 8: Công bố đơn Nhật số 7-121228

Tài liệu sáng chế 9: Công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 2000-189175

Tài liệu sáng chế 10: Công bố đơn patent Mỹ số 2008/0171370

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: Akashi K. và cộng sự, Amino axit Fermentation, Japan Scientific Societies Press, 195-215, 1986

Tài liệu phi sáng chế 2: J. Biol. Chem, 267, 3731-3734, 1992

Tài liệu phi sáng chế 3: Smith K.S., Ferry J.G., "Prokaryotic Cacbonic Anhydrases", FEMS Microbiol. Rev., 24(4):335-66, 2000

Tài liệu phi sáng chế 4: Appl. Microbiol. Biotechnol., 63, 592-601, 2004

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp mới để sản xuất axit amin dạng L, đặc biệt là axit L-glutamic, L-glutamin, L-prolin, L-arginin, L-asparagin, axit L-aspartic, L-lysin, L-methionin, L-threonin hoặc L-isoleuxin, bằng cách lên men.

Các tác giả sáng chế đã tiến hành các nghiên cứu khác nhau để đạt được mục đích nêu trên. Kết quả là họ đã phát hiện ra rằng bằng cách nuôi cấy vi khuẩn Coryneform cho khả năng sản sinh axit amin dạng L và cải biến để gia tăng hoạt tính cacbonic anhydraza (từ đây cacbonic anhydraza gọi là β-cacbonic anhydraza trừ khi được chỉ ra cụ thể), axit amin dạng L như axit L-glutamic, L-glutamin, L-prolin, L-arginin, L-asparagin, axit L-aspartic, L-lysin, L-methionin, L-threonin và L-isoleuxin có thể được sản xuất một cách hữu hiệu, và đã hoàn thiện sáng chế.

Do đó, sáng chế đề cập đến các khía cạnh sau.

(1) Phương pháp sản xuất axit amin dạng L, bao gồm bước muôi cấy vi khuẩn Coryneform có khả năng sản sinh axit amin dạng L trong môi trường để tạo ra và tích tụ axit amin dạng L trong môi trường hoặc các tế bào vi khuẩn, và thu gom axit amin dạng L từ môi trường hoặc các tế bào, trong đó vi khuẩn Coryneform đã nêu được cải biến để gia tăng hoạt tính của cacbonic anhydraza.

(2) Phương pháp theo mục (1), trong đó hoạt tính của cacbonic anhydraza đã nêu được gia tăng bằng cách tăng số bản sao của gen mã hóa cacbonic anhydraza, hoặc bằng cách cải biến trình tự kiểm soát biểu hiện của gen.

(3) Phương pháp theo mục (2), trong đó gen mã hóa cacbonic anhydraza

là ADN được xác định theo (a) hoặc (b) sau đây:

(a) ADN bao gồm trình tự nucleotit của các số nucleotit từ 562 đến 1182 của SEQ ID NO: 11, hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 13, hoặc

(b) ADN mà có thể lai với trình tự bổ sung của trình tự nucleotit của các số nucleotit từ 562 đến 1182 của SEQ ID NO: 11, hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 13 dưới các điều kiện nghiêm ngặt, và mã hóa protein có hoạt tính của cacbonic anhydraza.

(4) Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3), trong đó vi khuẩn được cải biến thêm để cho hoạt tính của D-xyloza-5-phosphat phosphoketolaza và/hoặc hoạt tính fructoza-6-phosphat phosphoketolaza.

(5) Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4), trong đó vi khuẩn được cải biến thêm để gia tăng hoạt tính của phosphotransaxetylaza.

(6) Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (5), trong đó vi khuẩn được cải biến thêm để gia tăng hoạt tính của pyruvat carboxylaza.

(7) Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (6), trong đó vi khuẩn được cải biến thêm để gia tăng hoạt tính của phosphoenolpyruvat carboxylaza.

(8) Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (7), trong đó axit amin dạng L được chọn từ nhóm bao gồm axit L-glutamic, L-glutamin, L-prolin, L-arginin, L-leuxin và L-xystein.

Theo phương pháp sản xuất của sáng chế, các axit amin dạng L như axit L-glutamic, L-glutamin, L-prolin, L-arginin, L-asparagin, axit L-aspartic, L-lysin, L-methionin, L-threonin và L-isoleuxin có thể được sản xuất một cách hiệu quả.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 thể hiện lượng tích tụ axit amin dạng L quan sát được với chủng gia tăng cacbonic anhydraza (BCA).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được giải thích một cách chi tiết.

<1> Vi khuẩn Coryneform được sử dụng cho phương pháp của sáng chế

Vi khuẩn Coryneform được sử dụng cho phương pháp theo sáng chế là vi khuẩn coryneform có khả năng sản sinh axit amin dạng L và cải biến để gia tăng hoạt tính của cacbonic anhydraza. Vi khuẩn Coryneform được sử dụng cho phương pháp theo sáng chế có thể thu được bằng cách sử dụng vi khuẩn Coryneform có khả năng sản sinh axit amin dạng L như chủng cha mẹ, và cải biến nó sao cho hoạt tính của cacbonic anhydraza của nó được gia tăng. Vi khuẩn Coryneform được sử dụng cho phương pháp theo sáng chế có thể là vi khuẩn Coryneform vốn có khả năng sản sinh axit amin dạng L, hoặc có thể là vi khuẩn Coryneform cho khả năng sản sinh axit amin dạng L bằng cách nhân giống sử dụng phương pháp đột biến, kỹ thuật ADN tái tổ hợp, hoặc tương tự. Theo sáng chế, "vi khuẩn Coryneform" cũng gồm vi khuẩn đã được phân loại từ trước thành chủng *Brevibacterium* mà hiện được phân loại vào chủng *Corynebacterium* (Int. J. Syst. Bacteriol., 41:255-260, 1991), và vi khuẩn thuộc chủng *Brevibacterium,* các vi khuẩn này cũng có quan hệ gần gũi với chủng *Corynebacterium*. Các ví dụ về vi khuẩn Coryneform này bao gồm các vi khuẩn sau đây:

Corynebacterium axetoacidophilum

Corynebacterium axetoglutamicum

Corynebacterium alkanolyticum

Corynebacterium callunae

Corynebacterium glutamicum

Corynebacterium lilium

Corynebacterium melassecola

Corynebacterium thermoaminogenes (Corynebacterium efficiens)

Corynebacterium herculis

Brevibacterium divaricatum

Brevibacterium flavum

Brevibacterium immariophilum

Brevibacterium lactofermentum

Brevibacterium roseum

Brevibacterium saccharolyticum

Brevibacterium thiogenitalis

Corynebacterium amoniacgenes

Brevibacterium album

Brevibacterium cerinum

Microbacterium amoniacphilum

Các ví dụ cụ thể về các vi khuẩn này gồm các chủng sau đây:

Corynebacterium axetoacidophilum ATCC 13870

Corynebacterium axetoglutamicum ATCC 15806

Corynebacterium alkanolyticum ATCC 21511

Corynebacterium callunae ATCC 15991

Corynebacterium glutamicum ATCC 13020, ATCC 13032, ATCC 13060

Corynebacterium lilium ATCC 15990

Corynebacterium melassecola ATCC 17965

Corynebacterium thermoaminogenes AJ12340 (FERM BP-1539)

Corynebacterium herculis ATCC 13868

Brevibacterium divaricatum ATCC 14020

Brevibacterium flavum ATCC 13826, ATCC 14067

Brevibacterium immariophilum ATCC 14068

Brevibacterium lactofermentum ATCC 13869

Brevibacterium roseum ATCC 13825

Brevibacterium saccharolyticum ATCC 14066

Brevibacterium thiogenitalis ATCC 19240

Corynebacterium amoniacgenes ATCC 6871, ATCC 6872

Brevibacterium album ATCC 15111

Brevibacterium cerinum ATCC 15112

Microbacterium amoniacphilum ATCC 15354

Các chủng này, ví dụ, có bán bởi American Type Culture Collection (địa chỉ: 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, United States of America). Tức là, các số đăng ký được gán cho mỗi chủng, và các chủng có thể được đặt bằng cách sử dụng các số đăng

ký này (xem http://www.atcc.org/). Các số đăng ký của các chủng được liệt kê trong danh mục của American Type Culture Collection. Chủng AJ12340 được ký gửi ngày 27/10/ 1987 tại National Institute of Bioscience và Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of Economy, Trade và Industry (hiện nay là cơ quan quản lý độc lập, National Institute of Advanced Industrial Science và Technology, International Patent Organism Depositary, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-5466, Japan) với phiên mã số FERM BP-1539 theo các quy định của công ước Budapest.

Theo sáng chế, "khả năng sản sinh axit amin dạng L" có nghĩa là khả năng của vi khuẩn Coryneform được sử dụng cho phương pháp theo sáng chế để tích tụ axit amin dạng L trong môi trường, khi vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường này. Khả năng sản sinh axit amin dạng L này có thể là đặc tính mà chủng hoang dại của vi khuẩn Coryneform có, hoặc đặc tính có được hoặc gia tăng bằng cách nhân giống.

Các ví dụ về axit amin dạng L bao gồm L-lysin, axit L-glutamic, L-threonin, L-valin, L-leuxin, L-isoleuxin, L-serin, axit L-aspartic, L-asparagin, L-glutamin, L-arginin, L-xystein (xystin), L-methionin, L-phenylalanin, L-tryptophan, L-tyrosin, L-glyxin, L-alanin, L-prolin, L-ornithin, L-xitrulin, và L-homoserin. Tuy nhiên, các axit amin dạng L có nguồn gốc từ axit oxaloaxetic và axetyl-CoA được ưu tiên, và axit L-glutamic, L-glutamin, L-prolin, L-arginin, L-asparagin, axit L-aspartic, L-lysin, L-methionin, L-threonin, và L-isoleuxin đặc biệt được ưu tiên.

<1-1> Truyền khả năng sản sinh axit amin dạng L

Sau đây, các phương pháp để truyền khả năng sản sinh axit amin dạng L cho vi khuẩn Coryneform và vi khuẩn Coryneform được truyền khả năng sản sinh axit amin dạng L sẽ được giải thích dựa vào các ví dụ.

Các ví dụ về phương pháp để truyền hoặc gia tăng khả năng sản sinh axit L-glutamic bằng cách nhân giống, ví dụ, bao gồm phương pháp cải biến vi khuẩn sao cho sự biểu hiện gen mã hóa enzym tham gia trong quá trình sinh tổng hợp axit L-glutamic. Các ví dụ về enzym này tham gia trong quá trình sinh tổng hợp axit L-glutamic, ví dụ, bao gồm glutamat dehydrogenaza, glutamin synthetaza, glutamat synthaza, isoxitrat dehydrogenaza, aconitat hydrataza,

xitrat synthaza, phosphoenolpyruvat carboxylaza, pyruvat carboxylaza, pyruvat dehydrogenaza, pyruvat kinaza, phosphoenolpyruvat synthaza, enolaza, phosphoglyxeromutaza, phosphoglyxerat kinaza, các glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza, triosephosphat isomeraza, fructoza bisphosphat aldolaza, phosphofructokinaza, glucoza phosphat isomeraza, và v.v..

Các ví dụ về phương pháp để gia tăng sự biểu hiện các gen này như nêu trên bao gồm việc đưa plasmit khuếch đại thu được bằng cách đưa đoạn ADN chứa bất kỳ một trong số các gen này vào plasmit phù hợp, ví dụ, plasmit chứa ít nhất gen chịu trách nhiệm sao chép và các chức năng tăng sinh của plasmit trong vi khuẩn Coryneform, tăng số bản sao của gen bất kỳ trong số các gen trên nhiễm sắc thể bằng cách tiếp hợp, chuyển gen, hoặc tương tự, và việc đưa đột biến vào vùng khởi đầu của gen bất kỳ trong số các gen này (xem công bố đơn quốc tế WO95/34672)

Khi sử dụng plasmit khuếch đại nêu trên, hoặc số bản sao được gia tăng trên nhiễm sắc thể, gen khởi đầu để biểu hiện các gen này cũng có thể là gen khởi đầu bất kỳ tới chừng nào gen khởi đầu đóng chức năng trong vi khuẩn Coryneform được chọn, và có thể là đoạn khởi đầu của bản thân gen sử dụng. Lượng biểu hiện của gen cũng có thể được kiểm soát bằng cách chọn phù hợp đoạn khởi đầu. Các ví dụ về vi khuẩn Coryneform được cải biến bằng các phương pháp này như nêu trên sao cho sự biểu hiện gen xitrat synthaza, gen phosphoenolpyruvat carboxylaza và/hoặc gen glutamat dehydrogenaza được gia tăng gồm vi khuẩn Coryneform được bộc lộ trong WO00/18935 và v.v..

Sự cải biến để truyền khả năng sản sinh axit L-glutamic có thể thu được bằng cách khử hoặc giảm hoạt tính của enzym mà xúc tác phản ứng rẽ nhánh từ con đường sinh tổng hợp axit L-glutamic và tạo ra hợp chất khác với axit L-glutamic. Các ví dụ về enzym này xúc tác phản ứng rẽ nhánh từ con đường sinh tổng hợp axit L-glutamic và tạo ra hợp chất khác với axit L-glutamic gồm isoxitrat lyaza, α-ketoglutarat dehydrogenaza, phosphat axetyltransferaza, axetat kinaza, axetohydroxy axit synthaza, axetolactat synthaza, format axetyltransferaza, lactat dehydrogenaza, glutamat decarboxylaza, 1-pyrolin dehydrogenaza, và v.v..

Để khử hoặc loại bỏ các hoạt tính của các enzym này, đột biến có thể được đưa đoạn khởi đầu vào các gen của các enzym trên nhiễm sắc thể bằng

phương pháp gây đột biến thông thường sao cho các hoạt tính nội bào của các enzym bị khử hoặc loại bỏ. Việc đưa đột biến này có thể thu được, ví dụ, bằng cách sử dụng tái tổ hợp gen để loại bỏ các gen mã hóa các enzym trên nhiễm sắc thể hoặc cải biến trình tự kiểm soát biểu hiện như gen khởi đầu hoặc trình tự Shine-Dalgarno (SD). Sự đột biến cũng có thể thu được bằng cách đưa đột biến để thế axit amin (đột biến sai nghĩa), codon kết thúc (đột biến vô nghĩa), hoặc đột biến dịch khung để bổ sung hoặc xóa một hoặc hai nucleotit vào các vùng mã hóa các enzym trên nhiễm sắc thể, hoặc xóa bỏ một phần các gen (J. Biol. Chem., 272:8611-8617, 1997). Các hoạt tính của enzym cũng có thể bị giảm hoặc mất bằng cách thiết kế gen mã hóa enzym đột biến, mà vùng mã hóa của nó bị xóa, và thế nó cho gen bình thường trên nhiễm sắc thể bằng cách tái tổ hợp tương đồng hoặc tương tự.

Ví dụ, để giảm hoạt tính của α-ketoglutarat dehydrogenaza, sự cải biến có thể được tiến hành bằng cách sử dụng gen *sucA* (*odhA*) mã hóa phân đoạn E1o của enzym.

Trình tự nucleotit của gen *sucA* và trình tự axit amin được mã hóa nhờ đó được thể hiện là các trình tự SEQ ID NO: 9 và 10. Ví dụ, sự gãy gen *sucA* có thể được thực hiện bằng phương pháp được mô tả trong ví dụ mô tả dưới đây sử dụng các đoạn mồi của SEQ ID NO: từ 1 đến 6.

Ngoài ra, các ví dụ về các chủng có hoạt tính của α-ketoglutarat dehydrogenaza giảm, ví dụ, bao gồm các chủng sau đây:

Chủng *Brevibacterium lactofermentum* ΔS (WO95/34672)

Brevibacterium lactofermentum AJ12821 (FERM BP-4172, patent Pháp số 9401748)

Brevibacterium flavum AJ12822 (FERM BP-4173, patent Pháp số 9401748)

Corynebacterium glutamicum AJ12823 (FERM BP-4174, patent Pháp số 9401748)

Các ví dụ về các phương pháp khác để truyền hoặc gia tăng khả năng sản sinh axit L-glutamic cũng bao gồm phương pháp truyền khả năng kháng lại axit tương đồng của axit hữu cơ, chất ức chế chuỗi hô hấp, hoặc tương tự, và phương pháp truyền tính nhạy cho chất ức chế tổng hợp thành tế bào. Các ví dụ về các

phương pháp này bao gồm phương pháp truyền khả năng kháng lại các benzopyron hoặc naphtoquinon (công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 56-1889), phương pháp truyền khả năng kháng lại HOQNO (công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 56-140895), phương pháp truyền khả năng kháng axit α-ketomalonic (công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 57-2689), phương pháp truyền khả năng kháng lại guanidin (công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 56-35981), phương pháp truyền tính nhạy penixilin (công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 4-88994), và v.v..

Các ví dụ cụ thể về các chủng kháng này bao gồm các chủng sau đây:

Brevibacterium flavum AJ11355 (FERM P-5007, xem công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 56-1889)

Corynebacterium glutamicum AJ11368 (FERM P-5020, xem công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 56-1889)

Brevibacterium flavum AJ11217 (FERM P-4318, xem công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 57-2689)

Corynebacterium glutamicum AJ11218 (FERM P-4319, xem công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 57-2689)

Brevibacterium flavum AJ11564 (FERM BP-5472, xem công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 56-140895)

Brevibacterium flavum AJ11439 (FERM BP-5136, xem công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 56-35981)

Corynebacterium glutamicum H7684 (FERM BP-3004, xem công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 04-88994)

Các ví dụ về phương pháp truyền khả năng sản sinh L-glutamin, ví dụ, bao gồm phương pháp cải biến vi khuẩn sao cho sự biểu hiện gen mã hóa enzym tham gia trong quá trình sinh tổng hợp L-glutamin được gia tăng. Các ví dụ về enzym tham gia trong quá trình sinh tổng hợp L-glutamin, ví dụ, bao gồm glutamin synthetaza và glutamat dehydrogenaza (công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 2002-300887).

Sự cải biến để truyền khả năng sản sinh L-glutamin cũng có thể thu được bằng việc giảm hoặc xóa bỏ hoạt tính của enzym xúc tác phản ứng rẽ nhánh từ

con đường sinh tổng hợp của L-glutamin và tạo ra một hợp chất khác. Ví dụ, có thể thu được việc khử hoạt tính của glutaminaza nội bào (công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 2004-187684).

Các ví dụ về các phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản sinh L-glutamin cũng bao gồm việc truyền khả năng kháng lại các đồng đẳng của axit amin và v.v.. Các ví dụ cụ thể bao gồm gồm việc truyền khả năng kháng 6-diazo-5-oxo-norleuxin (công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 3-232497), truyền khả năng kháng đồng đẳng purin và/hoặc khả năng kháng methionin sulfoxit (công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 61-202694), truyền khả năng kháng axit α-ketomalonic (công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 56-151495), truyền khả năng kháng peptit chứa axit glutamic (công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 2-186994), và v.v..

Các ví dụ cụ thể về vi khuẩn Coryneform có khả năng sản sinh L-glutamin bao gồm các chủng sau đây:

Brevibacterium flavum AJ11573 (FERM P-5492, công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 56-151495)

Brevibacterium flavum AJ12210 (FERM P-8123, công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 61-202694)

Brevibacterium flavum AJ12212 (FERM P-8125, công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 61-202694)

Brevibacterium flavum AJ12418 (FERM-BP2205, công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 2-186994)

Brevibacterium flavum DH18 (FERM P-11116, công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 3-232497)

Corynebacterium melassecola DH344 (FERM P-11117, công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 3-232497)

Corynebacterium glutamicum AJ11574 (FERM P-5493, công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 56-151495)

Các ví dụ về phương pháp truyền khả năng sản sinh L-prolin, ví dụ, bao gồm phương pháp cải biến vi khuẩn sao cho sự biểu hiện gen mã hóa enzym tham gia trong quá trình sinh tổng hợp L-prolin được gia tăng. Các ví dụ về

enzym tham gia trong quá trình sinh tổng hợp L-prolin, ví dụ, bao gồm glutamat-5-kinaza, γ-glutamylphosphat reductaza, và pyrolin-5-carboxylat reductaza.

Sự cải biến để truyền khả năng sản sinh L-prolin cũng có thể được tiến hành bằng cách giảm hoặc xóa hoạt tính của enzym xúc tác phản ứng rẽ nhánh từ con đường sinh tổng hợp L-prolin để tạo ra một hợp chất khác. Các ví dụ, chẳng hạn, bao gồm việc giảm hoạt tính của ornithin aminotransferaza nội bào.

Các ví dụ về phương pháp truyền khả năng sản sinh L-arginin bao gồm phương pháp cải biến vi khuẩn sao cho sự biểu hiện gen mã hóa enzym tham gia trong quá trình sinh tổng hợp L-arginin được gia tăng. Các ví dụ về các enzym sinh tổng hợp L-arginin bao gồm một hoặc nhiều enzym được chọn từ N-axetylglutamyl phosphat reductaza (*argC*), ornithin axetyltransferaza (*argJ*), N-axetylglutamat kinaza (*argB*), axetylornithin transaminaza (*argD*), ornithin carbamoyl transferaza (*argF*), argininosucxinat synthaza (*argG*), argininosucxinat lyaza (*argH*), và carbamoyl-phosphat synthaza.

Một phương pháp truyền khả năng sản sinh L-arginin khác là phương pháp truyền khả năng kháng đồng đẳng của axit amin hoặc tương tự. Các ví dụ về vi khuẩn thu được bằng phương pháp này bao gồm vi khuẩn Coryneform thể hiện L-histidin, L-prolin, L-threonin, L-isoleuxin, L-methionin, hoặc dinh dưỡng sinh trưởng L-tryptophan ngoài khả năng kháng 2-thiazolalanin (công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 54-44096); vi khuẩn Coryneform kháng axit ketomalonic, axit flomalonic hoặc axit monofloaxetic (công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 57-18989); vi khuẩn Coryneform kháng argininol (công bố đơn Nhật số 62-24075); vi khuẩn Coryneform kháng X-guanidin (X thể hiện dẫn xuất của axit béo hoặc mạch béo, công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 2-186995); vi khuẩn Coryneform kháng arginin hydroxamat và 6-azauraxil (công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 57-150381), và v.v..

Ngoài ra, do L-arginin, L-glutamin và L-prolin bao gồm axit L-glutamic như cấu trúc cơ bản, vi khuẩn có khả năng tạo ra một axit amin bất kỳ có thể được nhân giống bằng cách khuếch đại gen mã hóa enzym xúc tác phản ứng tạo ra axit amin dạng L bất kỳ từ axit L-glutamic trong vi khuẩn sản sinh axit L-glutamic như nêu trên.

Ngoài ra, con đường sinh tổng hợp của L-xitrulin và L-ornithin là chung

với con đường sinh tổng hợp L-arginin, và do đó khả năng tạo ra chúng có thể được truyền bằng cách gia tăng các hoạt tính của enzym của N-axetylglutamat synthaza (*argA*), N-axetylglutamyl phosphat reductaza (*argC*), ornithin axetyltransferaza (*argJ*), N-axetylglutamat kinaza (*argB*), axetylornithin transaminaza (*argD*) và axetylornithin deaxetylaza (*argE*).

Như vi khuẩn Coryneform có khả năng sản sinh L-xystein, ví dụ đã biết vi khuẩn Coryneform mà hoạt tính của serin axetyltransferaza nội bào được gia tăng bằng cách có serin axetyltransferaza mất nhạy với sự ức chế hồi tiếp bởi L-xystein (công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 2002-233384).

Các ví dụ về phương pháp truyền khả năng sản sinh L-valin, ví dụ, bao gồm phương pháp cải biến vi khuẩn sao cho sự biểu hiện gen mã hóa enzym tham gia trong quá trình sinh tổng hợp L-valin được gia tăng. Các ví dụ về enzym tham gia quá trình sinh tổng hợp L-valin gồm các enzym được mã hóa bằng các gen có mặt trên *ilvBNC* operon, tức là, axetohydroxy axit synthetaza mã hóa bằng *ilvBN* và isomero-reductaza mã hóa bằng *ilvC* (WO00/50624). Do *ilvBNC* operon chịu sự điều tiết biểu hiện của operon bởi L-valin và/hoặc L-isoleuxin và/hoặc L-leuxin, nên mong muốn là loại bỏ sự suy giảm để tránh sự ức chế biểu hiện bởi L-valin tạo thành.

Vi khuẩn Coryneform có khả năng sản sinh L-valin cũng có thể thu được bằng cách giảm hoặc loại trừ hoạt tính của ít nhất một loại enzym tham gia trong quá trình trao đổi chất làm giảm sự sản sinh L-valin. Ví dụ, có thể thu được việc giảm hoạt tính của threonin dehydrataza tham gia trong quá trình tổng hợp L-leuxin, hoặc hoạt tính của enzym tham gia trong quá trình tổng hợp D-pantothenat (WO00/50624).

Các ví dụ về các phương pháp truyền khả năng sản sinh L-valin cũng bao gồm truyền khả năng kháng đồng đẳng của axit amin hoặc tương tự. Các ví dụ về vi khuẩn thu được bằng phương pháp, ví dụ, bao gồm các chủng đột biến mà là dinh dưỡng thụ động với L-isoleuxin và L-methionin, và kháng D-riboza, purin ribonucleosit hoặc pyrimidin ribonucleosit, và có khả năng sản sinh L-valin (FERM P-1841, FERM P-29, công bố đơn Nhật số 53-025034), các chủng đột biến kháng các polyketit (FERM P-1763, FERM P-1764, công bố đơn Nhật số 06-065314), và các chủng đột biến kháng L-valin trong môi trường chứa axit axetic như nguồn cacbon duy nhất và nhạy cảm với các đồng đẳng của axit

pyruvic (axit β-flopyruvic, v.v.) trong môi trường chứa glucoza làm nguồn cacbon duy nhất (FERM BP-3006, BP-3007, patent Nhật số 3006929).

Các ví dụ về vi khuẩn Coryneform được truyền khả năng sản sinh L-alanin, ví dụ, bao gồm vi khuẩn Coryneform thiếu hoạt tính của H^+-ATPaza (Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001 Nov., 57(4):534-40), vi khuẩn Coryneform trong đó gen aspartat β-decarboxylaza được khuếch đại (công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 07-163383), và v.v..

Các ví dụ về vi khuẩn Coryneform được truyền khả năng sản sinh L-lysin gồm các chủng kháng đồng đẳng của lysin hoặc các chủng đột biến điều hòa trao đổi chất có khả năng sản sinh L-lysin. Các ví dụ cụ thể bao gồm S-(2-aminoetyl)-xystein (sau đây viết tắt là "AEC") kháng các chủng đột biến (*Brevibacterium lactofermentum* AJ11082 (NRRL B-11470) v.v., xem công bố đơn Nhật số 56-1914, 56-1915, 57-14157, 57-14158, 57-30474, 58-10075, 59-4993, 61-35840, 62-24074, 62-36673, 5-11958, 7-112437 và 7-112438); các chủng đột biến cần axit amin như L-homoserin cho sự phát triển của chúng (xem công bố đơn patent Nhật số 48-28078 và 56-6499); các chủng đột biến thể hiện khả năng kháng AEC và còn cần axit amin như L-leuxin, L-homoserin, L-prolin, L-serin, L-arginin, L-alanin và L-valin (xem Patent Mỹ số 3,708,395 và 3,825,472); các chủng đột biến sản sinh L-lysin thể hiện kháng DL-α-amino-ε-caprolactam, α-amino-laurolactam, đồng đẳng của axit aspartic, thuốc sulfa, quinoit và N-lauroylleuxin; các chủng đột biến sản sinh L-lysin thể hiện kháng oxaloaxetat decarboxylaza hoặc chất ức chế enzym đường hô hấp (công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 50-53588, 50-31093, 52-102498, 53-9394, 53-86089, 55-9783, 55-9759, 56-32995, 56-39778, công bố đơn patent Nhật số 53-43591 và 53-1833); các chủng đột biến sản sinh L-lysin đòi hỏi inositol hoặc axit axetic (công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 55-9784 và 56-8692); các chủng đột biến sản sinh L-lysin dễ chịu axit flopyruvic hoặc nhiệt độ 34°C hoặc cao hơn (công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 55-9783 và 53-86090); các chủng đột biến sản sinh L-lysin của vi khuẩn *Brevibacterium* hoặc *Corynebacterium* thể hiện kháng etylen glycol (Patent Mỹ số 4,411,997), và v.v..

Ngoài ra, vi khuẩn Coryneform được truyền khả năng sản sinh L-lysin cũng có thể thu được bằng cách gia tăng hoạt tính của enzym sinh tổng hợp L-lysin. Sự gia tăng hoạt tính của enzym này có thể đạt được bằng cách tăng số

bản sao của gen mã hóa enzym trong các tế bào, hoặc bằng cách cải biến trình tự kiểm soát biểu hiện của chúng.

Các ví dụ về các gen mã hóa các enzym sinh tổng hợp L-lysin gồm các gen mã hóa các enzym của con đường diaminopimelat như gen dihydrodipicolinat synthaza (*dapA*), gen aspartokinaza (*lysC*), gen dihydrodipicolinat reductaza (*dapB*), gen diaminopimelat decarboxylaza (*lysA*), gen diaminopimelat dehydrogenaza (*ddh*) (WO96/40934 đối với tất cả các gen nêu trên), gen phosphoenolpyrvat carboxylaza (*ppc*) (công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 60-87788), gen aspartat aminotransferaza (*aspC*) (công bố đơn patent Nhật số 6-102028), gen diaminopimelat epimeraza (*dapF*) (công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 2003-135066), và gen aspartat semialdehyt dehydrogenaza (*asd*) (WO00/61723), các gen mã hóa các enzym của con đường axit aminoadipic như gen homoaconitat hydrataza (công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 2000-157276), và v.v., vi khuẩn Coryneform cải biến bằng cách sử dụng các gen này được bộc lộ trong công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 10-215883, 10-165180, WO96/40934, v.v..

Như gen mã hóa aspartokinaza III (*lysC*), gen cải biến sao cho enzym được khử nhạy để ức chế hồi tiếp bằng L-lysin tốt hơn được sử dụng. Gen *lysC* cải biến để khử nhạy ức chế hồi tiếp có thể thu được bằng phương pháp được mô tả trong Patent Mỹ số 5,932,453.

Ngoài ra, vi khuẩn Coryneform được truyền khả năng sản sinh L-lysin có thể có hoạt tính của enzym giảm mà xúc tác phản ứng tạo ra hợp chất khác với L-lysin hoặc có thể thiếu hoạt tính này, hoặc các gen có thể bị khử hoạt tính của enzym mà tác động ngược đến sự sản sinh L-lysin, hoặc có thể bị thiếu hụt hoạt tính đó. Các ví dụ về các enzym này bao gồm gồm homoserin dehydrogenaza, lysin decarboxylaza (*cadA, ldcC*), và enzym malic, và các chủng trong đó các hoạt tính của các enzym này giảm hoặc mất được bộc lộ trong WO95/23864, và v.v..

Các ví dụ ưu tiên về vi khuẩn Coryneform được truyền khả năng sản sinh L-tryptophan là vi khuẩn trong đó một, hai hoặc nhiều hoạt tính trong số hoạt tính của anthranilat synthetaza, hoạt tính của phosphoglyxerat dehydrogenaza, và hoạt tính của tryptophan synthaza được tăng cường. Do anthranilat synthetaza và phosphoglyxerat dehydrogenaza chịu sự ức chế hồi tiếp lần lượt

bởi L-tryptophan và L-serin, nên các hoạt tính của enzym của nó có thể được tăng cường bằng cách tạo ra vi khuẩn có enzym đột biến loại khử nhạy.

Hơn nữa, khả năng sản sinh L-tryptophan cũng có thể được truyền bằng cách đưa ADN tái tổ hợp chứa operon tryptophan. Hơn nữa, khả năng sản sinh L-tryptophan có thể được gia tăng hoặc truyền bằng cách gia tăng sự biểu hiện gen mã hóa tryptophan synthaza trong operon tryptophan (*trpBA*). Tryptophan synthaza bao gồm các phân đoạn α và β, mà lần lượt được mã hóa bằng các gen *trpA* và *trpB*. Trình tự nucleotit của operon tryptophan và trình tự nucleotit của *trpA* và *trpB* được đăng ký là mã truy cập ngân hàng gen số J01714 (WO2005/103275).

Các ví dụ về vi khuẩn Coryneform được truyền khả năng sản sinh L-tryptophan gồm *Brevibacterium flavum* AJ11667 (xem công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 57-174096).

Các ví dụ về vi khuẩn Coryneform được truyền khả năng sản sinh L-tyrosin gồm *Corynebacterium glutamicum* AJ11655 (FERM P-5836, xem công bố đơn patent Nhật số 2-6517), và *Brevibacterium lactofermentum* AJ12081 (FERM P-7249, xem công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 60-70093).

Các ví dụ về vi khuẩn Coryneform có khả năng sản sinh L-phenylalanin bao gồm chủng thể hiện sự kháng dinh dưỡng sinh trưởng tyrosin và L-phenylalanyl-L-tyrosin (công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 5-49489) và *Brevibacterium lactofermentum* AJ12637 (FERM BP-4160, xem công bố đơn patent Pháp không xét nghiệm số 2,686,898).

L-Tryptophan, L-phenylalanin, và L-tyrosin là tất cả các axit amin thơm và có chung con đường sinh tổng hợp. Các ví dụ về các gen mã hóa các enzym sinh tổng hợp cho các axit amin thơm này bao gồm deoxyarabino-heptulosonat phosphat synthaza (*aroG*), 3-dehydroquinat synthaza (*aroB*), dehydrataza của axit shikimic, shikimat kinaza (*aroL*), 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat synthaza (*aroA*), và chorismat synthaza (*aroC*) (công bố đơn patent Châu Âu không xét nghiệm số 763127). Do đó, khả năng sản sinh axit amin thơm có thể được gia tăng bằng cách tăng số bản sao của gen mã hóa bất kỳ một trong số các enzym này trên plasmit hoặc bộ gen. Đã biết rằng các gen này được kiểm soát bằng gen kìm hãm tyrosin (*tyrR*), và nên hoạt tính của enzym sinh tổng hợp axit amin thơm cũng có thể được gia tăng bằng cách xóa gen *tyrR* (xem công bố đơn

patent Châu Âu không xét nghiệm số 763127).

Hơn nữa, các ví dụ về vi khuẩn Coryneform có khả năng sản sinh L-threonin gồm *Corynebacterium axetoacidophilum* AJ12318 (FERM BP-1172, xem patent Mỹ số 5,188,949), và v.v..

Các ví dụ về vi khuẩn Coryneform được truyền khả năng sản sinh L-leuxin bao gồm *Brevibacterium lactofermentum* AJ3718 (FERM P-2516, 2-thiazolalanin và kháng β-hydroxyleuxin, và isoleuxin và dinh dưỡng thụ động methionin).

Các ví dụ về vi khuẩn Coryneform có khả năng sản sinh L-isoleuxin gồm *Brevibacterium flavum* AJ12149 (FERM BP-759, xem patent Mỹ số 4,656,135), và v.v..

<1-2> Tăng cường hoạt tính của cacbonic anhydraza

Bằng cách cải biến vi khuẩn Coryneform được truyền khả năng sản sinh axit amin dạng L này như đã nêu trên sao cho hoạt tính của cacbonic anhydraza của nó được gia tăng, vi khuẩn Coryneform được sử dụng cho phương pháp sản xuất theo sáng chế có thể thu được. Tuy nhiên, hoặc cải biến để gia tăng hoạt tính của cacbonic anhydraza hoặc truyền khả năng sản sinh axit amin dạng L có thể được tiến hành trước tiên.

Thuật ngữ " được cải biến để gia tăng hoạt tính của cacbonic anhydraza" bao gồm trạng thái mà số các phân tử cacbonic anhydraza trên mỗi tế bào được gia tăng, cũng như trạng thái mà hoạt tính trên mỗi phân tử cacbonic anhydraza được gia tăng, so với chủng cha mẹ hoặc chủng hoang dại, hoặc tương tự. Hơn nữa, chủng hoang dại sử dụng làm đối tượng so sánh, ví dụ có thể là chủng *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC 13869 hoặc chủng ATCC 13032.

Sự tăng cường hoạt tính của cacbonic anhydraza có thể được khẳng định bằng cách so sánh hoạt tính của cacbonic anhydraza hoặc lượng mRNA của gen mã hóa cacbonic anhydraza với chủng hoang dại hoặc chủng chưa cải biến. Các ví dụ về phương pháp khẳng định lượng biểu hiện bao gồm lai phương nam và RT-PCR (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA, 2001). Hoạt tính của enzym hoặc lượng biểu hiện có thể được gia tăng tới mức bất kỳ miễn là nó được gia tăng so với mức của chủng hoang dại

hoặc chủng không cải biến, và ví dụ, mong muốn là tăng không thấp hơn 1,5 lần, tốt hơn nữa không thấp hơn 2 lần, vẫn tốt hơn nữa không thấp hơn 3 lần, so với mức, ví dụ, của chủng hoang dại hoặc không cải biến.

Cacbonic anhydraza là enzym tham gia trong chuyển đổi qua lại của cacbon dioxit và gốc bicacbonat (EC 4.2.1.1). Hoạt tính của cacbonic anhydraza có thể được đo bằng phương pháp của Wilbur và cộng sự (Wilbur K.M., Anderson N.G., Electrometric và Colorimetric Determination of Cacbonic Anhydrase, J. Biol. Chem., 176:147-154, 1948).

Như các gen mã hóa cacbonic anhydraza (gen *ca*) của vi khuẩn Coryneform, hai loại gen, gen mã hóa cacbonic anhydraza loại β (*bca*) và gen mã hóa cacbonic anhydraza loại γ (*gca*), đã được báo cáo. Tốt hơn nữa, NCgl2579 của chủng *C. glutamicum* ATCC 13032 đăng ký tại Ngân hàng gen (tương ứng với *bca*, sợi bổ sung từ 2837954 đến 2838577 có mã truy cập BA_000036.3) có thể được sử dụng. Trình tự nucleotit của gen được thể hiện là SEQ ID NO: 13 (vùng mã hóa tương ứng với các số nucleotit từ 1 đến 621), và trình tự axit amin của protein mã hóa được thể hiện là SEQ ID NO: 14. Hơn nữa, trình tự nucleotit của gen *bca* của chủng *C. glutamicum* ATCC 13869 được thể hiện là các số nucleotit từ 562 đến 1182 trong SEQ ID NO: 11, và trình tự axit amin của protein mã hóa được thể hiện là SEQ ID NO: 12.

Ngoài ra, gen mà có thể được sử dụng cho sáng chế, như gen tương đồng của gen *ca* có nguồn gốc từ vi sinh vật khác có thể được sử dụng, miễn là nó có thể biểu hiện protein mà thể hiện hoạt tính của cacbonic anhydraza trong vi khuẩn Coryneform. Như là tương đồng của gen *ca* có thể được tra cứu bằng cách sử dụng BLAST hoặc tương tự dựa vào trình tự nucleotit của các số nucleotit từ 562 đến 1182 của SEQ ID NO: 11 hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 13 (http:/blast.genome.jp/).

Do trình tự gen *bca* mà có thể được sử dụng cho sáng chế đã được làm sáng tỏ, vùng bao gồm *bca* và vùng kiểm soát *bca* có thể thu được bằng PCR sử dụng các đoạn mồi được tạo ra trên cơ sở trình tự nucleotit nêu trên, ví dụ, các đoạn mồi được thể hiện là SEQ ID NO: 7 và 8, và ADN nhiễm sắc thể của vi khuẩn Coryneform làm vật mẫu. Các tương đồng *bca* của các vi sinh vật khác cũng có thể thu được theo cách tương tự.

Hơn nữa, do trình tự nucleotit của gen *bca* có thể khác nhau tùy thuộc

vào các loài hoặc chủng vi khuẩn Coryneform, gen *bca* được sử dụng cho sáng chế không bị giới hạn ở trình tự nucleotit của các số nucleotit từ 562 đến 1182 của SEQ ID NO: 11 hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 13, và nó có thể là gen đột biến hoặc cải biến nhân tạo mà mã hóa protein có trình tự SEQ ID NO: 12 hoặc 14, nhưng bao gồm sự thay thế, xóa, chèn, bổ sung, v.v., của một hoặc nhiều gốc axit amin ở một hoặc nhiều vị trí miễn là protein này có hoạt tính của cacbonic anhydraza. Mặc dù số có nghĩa là thuật ngữ "một hoặc một số" có thể khác nhau tùy thuộc vào các vị trí trong cấu trúc ba chiều của protein hoặc các loại gốc axit amin, cụ thể, số này có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 20, tốt hơn là 1 đến 10, tốt hơn nữa là từ 1 đến 5. Sự thay thế, xóa, chèn, bổ sung, đảo gốc axit amin hoặc tương tự mô tả ở trên cũng có thể bao gồm các loại do đột biến xuất hiện tự nhiên trên cơ sở các khác biệt cá thể, hoặc khác nhau về các loài vi sinh vật chứa gen *bca* (đột biến hoặc biến dị).

Sự thay thế nêu trên tốt hơn là sự thay thế bảo tồn mà là sự thay thế trung lập, tức là, một sự thay thế mà không dẫn đến thay đổi chức năng. Đột biến bảo tồn là đột biến trong đó sự thay thế xảy ra qua lại giữa Phe, Trp và Tyr, nếu vị trí thế là axit amin thơm; trong số Leu, Ile và Val, nếu vị trí thế là axit amin kỵ nước; giữa Gln và Asn, nếu nó là axit amin phân cực; trong số Lys, Arg và His, nếu nó là axit amin có tính kiềm; giữa Asp và Glu, nếu nó là axit amin có tính axit; và giữa Ser và Thr, nếu nó là axit amin có nhóm hydroxyl. Các ví dụ cụ thể về thay thế bảo tồn bao gồm: sự thay thế Ser hoặc Thr cho Ala; thế của Gln, His hoặc Lys cho Arg; sự thay thế của Glu, Gln, Lys, His hoặc Asp cho Asn; sự thay thế của Asn, Glu hoặc Gln cho Asp; sự thay thế của Ser hoặc Ala cho Cys; sự thay thế của Asn, Glu, Lys, His, Asp hoặc Arg cho Gln; sự thay thế của Gly, Asn, Gln, Lys hoặc Asp cho Glu; sự thay thế của Pro cho Gly; sự thay thế của Asn, Lys, Gln, Arg hoặc Tyr cho His; sự thay thế của Leu, Met, Val hoặc Phe cho Ile; sự thay thế của Ile, Met, Val hoặc Phe cho Leu; sự thay thế của Asn, Glu, Gln, His hoặc Arg cho Lys; sự thay thế của Ile, Leu, Val hoặc Phe cho Met; sự thay thế của Trp, Tyr, Met, Ile hoặc Leu cho Phe; sự thay thế của Thr hoặc Ala cho Ser; sự thay thế của Ser hoặc Ala cho Thr; sự thay thế của Phe hoặc Tyr cho Trp; sự thay thế của His, Phe hoặc Trp cho Tyr; và sự thay thế của Met, Ile hoặc Leu cho Val.

Ngoài ra, gen *bca* có thể bao gồm trình tự nucleotit mã hóa protein giống không dưới 80%, tốt hơn là không dưới 90%, tốt hơn nữa không dưới 95%, đặc

biệt tốt hơn là không dưới 97% với toàn bộ trình từ axit amin SEQ ID NO: 12 hoặc 14, và có hoạt tính của cacbonic anhydraza. Ngoài ra, mức thoái hóa của gen có thể thay đổi tùy thuộc vào vật chủ mà gen *bca* được đưa vào, và do đó các codon có thể được thay bằng các condon phù hợp với vật chủ đã chọn.

Ngoài ra, gen *bca* có thể mã hóa protein với trình tự đầu cuối C hoặc N kéo dài hoặc bị xóa, miễn là protein có hoạt tính của cacbonic anhydraza. Độ dài của trình tự axit amin được kéo dài hoặc xóa có thể là 50 gốc axit amin hoặc ít hơn, tốt hơn là 20 hoặc ít hơn, tốt hơn nữa 10 hoặc ít hơn, đặc biệt tốt hơn là 5 hoặc ít hơn. Cụ thể hơn, gen *bca* có thể mã hóa protein có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 12 hoặc 24, nhưng trong đó trình tự này được kéo dài khoảng 5 đến 50 gốc axit amin ở phía đầu cuối N hoặc đầu cuối C, hoặc 5 đến 50 gốc bị xóa ở đầu kia.

Các gen này tương đồng với gen *bca* mô tả ở trên có thể thu được bằng cách cải biến trình tự nucleotit của các số nucleotit từ 562 đến 1182 của SEQ ID NO: 11 hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 13 sao cho protein được mã hóa bởi gen chứa các thay thế, xóa, chèn, hoặc bổ sung gốc axit amin ở các vị trí đặc hiệu, ví dụ, bởi gây đột biến gen ở vị trí đặc hiệu. Ngoài ra, các gen tương đồng cũng có thể thu được bằng cách xử lý đột biến thông thường đã biết, như các phương pháp mô tả dưới đây. Ví dụ, trình tự nucleotit nêu trên có thể được xử lý bằng hydroxylamin hoặc tương tự trong ống nghiệm, hoặc vi sinh vật, ví dụ, vi khuẩn Coryneform, chứa gen có thể được xử lý bằng bức xạ tia tử ngoại hoặc tác nhân gây đột biến điển hình được sử dụng để gây đột biến, như N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG) hoặc etyl metansulfonat (EMS), hoặc đột biến có thể được đưa nhân tạo vào *bca* bằng cách tái tổ hợp gen trên cơ sở PCR có lỗi, xáo trộn ADN, hoặc StEP-PCR, sao cho có thể thu được gen *bca* hoạt tính cao (Firth A.E., Patrick W.M., Bioinformatics, 2005 Jun 2, Statistics of Protein Library Construction).

Các ví dụ về gen *bca* cũng bao gồm ADN mà lai với trình tự bổ sung của trình tự nucleotit của các số nucleotit từ 562 đến 1182 của SEQ ID NO: 11 hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 13, hoặc mẫu dò mà có thể được tạo ra từ các trình tự này dưới các điều kiện nghiêm ngặt và mã hóa cho protein mà có hoạt tính của cacbonic anhydraza. "Các điều kiện nghiêm ngặt" có thể là các điều kiện mà dưới các điều kiện này sự lai gọi là lai đặc hiệu được tiến hành, và sự lai

gọi là lai không đặc hiệu không được tiến hành. Các ví dụ về các điều kiện này, ví dụ, bao gồm các điều kiện mà ở đó các ADN có sự tương đồng cao với nhau, ví dụ, các ADN có sự tương đồng, ví dụ, không thấp hơn 80%, không thấp hơn 90%, không thấp hơn 95%, hoặc không thấp hơn 97%, lai với nhau, và các ADN có sự tương đồng thấp hơn các mức nêu trên không lai với nhau. "Các điều kiện nghiêm ngặt" cũng có thể bao gồm các điều kiện rửa mà điển hình trong quá trình lai phương nam, ví dụ, rửa một lần, hoặc hai lần hoặc ba lần, ở nồng độ muối và nhiệt độ 1 x SSC, 0,1% SDS ở nhiệt độ 60°C, tốt hơn là 0,1 x SSC, 0,1% SDS ở nhiệt độ 60°C, tốt hơn nữa 0,1 x SSC, 0,1% SDS ở nhiệt độ 68°C.

Trình tự riêng phần của trình tự nucleotit của các số nucleotit từ 562 đến 1182 của SEQ ID NO: 11 hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 13 cũng có thể được sử dụng làm mẫu dò. Mẫu dò này cũng có thể được tạo ra bởi PCR sử dụng các oligonucleotit được tạo ra trên cơ sở của một trong các trình tự nucleotit này làm các đoạn mồi và đoạn ADN chứa bất kỳ một trình tự nucleotit có các số nucleotit từ 562 đến 1182 của SEQ ID NO: 11 và trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 13 làm vật mẫu. Khi đoạn ADN có chiều dài khoảng 300 bp được sử dụng làm mẫu dò, ví dụ, các điều kiện rửa sau khi lai dưới các điều kiện nêu trên được lấy ví dụ là 2 x SSC, 0,1% SDS ở nhiệt độ 50°C.

Lượng biểu hiện gen *bca* có thể được tăng cường bằng cách tăng số bản sao của gen *bca*. Ví dụ, số bản sao của gen có thể được tăng bằng cách thắt đoạn chứa gen *bca* vào vectơ, tốt hơn là vectơ nhiều bản sao, mà có chức năng trong vi khuẩn Coryneform, để tao ra ADN tái tổ hợp, và biến nạp ADN này vào vi sinh vật có khả năng sản sinh axit amin dạng L như nêu trên. Theo cách khác, sau khi biến nạp chủng hoang dại của vi khuẩn Coryneform bằng cách đưa ADN tái tổ hợp như nêu trên, khả năng sản sinh axit amin dạng L có thể được truyền cho vi khuẩn biến nạp. Số bản sao của gen cũng có thể được gia tăng bằng cách chuyển bản sao duy nhất hoặc nhiều bản sao của gen *bca* vào nhiễm sắc thể vi khuẩn. Việc chuyển gen *bca* vào nhiễm sắc thể có thể được khẳng định bằng lai phương nam sử dụng phần gen *bca* làm mẫu dò.

Sự biểu hiện gen *bca* cũng có thể được tăng cường bằng cách cải biến trình tự kiểm soát biểu hiện của gen *bca*. Ví dụ, trình tự gen khởi đầu của gen *bca* có thể được thay bằng gen khởi đầu mạnh hơn, hoặc bằng cách tạo ra trình tự gen khởi đầu sát với trình tự đồng nghĩa (WO00/18935).

Các phương pháp cải biến vi khuẩn Coryneform để tăng cường hoạt tính của cacbonic anhydraza được giải thích dưới đây. Các phương pháp này có thể được tiến hành như được mô tả trong sổ tay như Tách dòng phân tử (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001).

Lượng biểu hiện của gen *bca* có thể được gia tăng bằng cách tăng số bản sao của gen *bca*, và số bản sao có thể được gia tăng bằng cách khuếch đại gen *bca* sử dụng plasmit như được mô tả dưới đây. Trước tiên, gen *bca* được nhân bản vô tính từ nhiễm sắc thể của vi khuẩn Coryneform. ADN nhiễm sắc thể có thể được tạo ra từ vi khuẩn dưới dạng thể cho ADN, ví dụ, bằng phương pháp của Saito và Miura (xem H. Saito và K. Miura, Biochem. Biophys. Acta, 72, 619, 1963; Text for Bioengineering Experiments, Edited by Society for Bioscience và Bioengineering, Japan, 97-98, Baifukan Co., Ltd., 1992), hoặc tương tự. Các oligonucleotit để sử dụng trong PCR có thể được tổng hợp trên cơ sở thông tin đã biết nêu trên, và ví dụ, các oligonucleotit tổng hợp được thể hiện trong các trình tự SEQ ID NO: 7 và 8 có thể được sử dụng để khuếch đại gen *bca*.

Đoạn gen bao gồm gen *bca* được khuếch đại bằng PCR có thể được thắt vào ADN vectơ có thể sao chép tự động trong các tế bào của *Escherichia coli* và/hoặc vi khuẩn Coryneform để tạo ra ADN tái tổ hợp, và ADN tái tổ hợp này có thể được đưa vào *Escherichia coli*, mà làm cho hoạt động sau đó dễ dàng hơn. Các ví dụ về các vectơ có thể sao chép tự động trong các tế bào của *Escherichia coli* gồm pUC19, pUC18, pHSG299, pHSG399, pHSG398, RSF1010, pBR322, pACYC184, pMW219, và v.v..

ADN nêu trên được đưa vào vectơ mà có chức năng trong vi khuẩn Coryneform. Vectơ mà có chức năng trong vi khuẩn Coryneform, ví dụ, là plasmit có thể sao chép tự động trong vi khuẩn Coryneform. Các ví dụ cụ thể về plasmit mà có thể sao chép tự động trong vi khuẩn Coryneform bao gồm plasmit pCRY30 được mô tả trong công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 3-210184; các plasmit pCRY21, pCRY2KE, pCRY2KX, pCRY31, pCRY3KE, và pCRY3KX được mô tả trong công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 2-72876 và Patent Mỹ số 5,185,262; các plasmit pCRY2 và pCRY3 được mô tả trong công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 1-191686; pAM330 được mô tả trong công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 58-67679; pHM1519 được mô tả trong công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 58-77895; pAJ655, pAJ611, và pAJ1844 được

mô tả trong công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 58-192900; pCG1 được mô tả trong công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 57-134500; pCG2 được mô tả trong công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 58-35197; pCG4, pCG11, v.v., được mô tả trong công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 57-183799; và pVK7 được mô tả trong công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 10-215883.

Hơn nữa, nếu đoạn ADN cho phép plasmit sao chép tự động trong vi khuẩn Coryneform được cắt bỏ từ bất kỳ một trong các vectơ này và đoạn này được chèn vào vectơ bất kỳ trong số các vectơ nêu trên cho *Escherichia coli*, vectơ thu được có thể được sử dụng làm cái gọi là vectơ con thoi mà có thể sao chép tự động cả ở *Escherichia coli* và vi khuẩn Coryneform.

Để điều chế ADN tái tổ hợp bằng cách thắt gen *bca* vào vectơ mà có chức năng trong vi khuẩn Coryneform, vectơ được cắt bằng enzym giới hạn phù hợp với các đầu của gen. Vị trí của enzym giới hạn này có thể được đưa trước vào oligonucleotit tổng hợp được sử dụng để khuếch đại gen *bca*. Việc thắt thường được tiến hành bằng cách sử dụng ligaza như T4 ADN ligaza.

Để đưa plasmit tái tổ hợp được tạo ra như được mô tả ở trên vào vi khuẩn Coryneform, phương pháp biến nạp đã biết bất kỳ được báo cáo đến nay có thể được sử dụng dụng. Ví dụ, các tế bào nhận có thể được xử lý bằng canxi clorua để gia tăng tính thấm cho ADN, mà đã được báo cáo cho *Escherichia coli* K-12 (Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159, 1970). Cũng vậy, các tế bào khả biến có thể được tạo ra từ các tế bào sinh trưởng và ADN có thể được đưa vào các tế bào này, mà đã được báo cáo đối với *Bacillus subtilis* (Duncan, C.H., Wilson, G.A. và Young, F.E., Gene, 1, 153, 1977). Một phương pháp khác là tạo ra các tế bào tiếp nhận ADN vào các thể nguyên sinh hoặc hạt cầu dễ dàng tiếp nhận ADN tái tổ hợp, và ADN tái tổ hợp có thể được đưa vào các tế bào này, mà đã biết đối với *Bacillus subtilis*, các xạ khuẩn, và nấm men (Chang, S. và Choen, S.N., Mol. Gen. Genet., 168, 111, 1979; Bibb, M.J., Ward, J.M. và Hopwood, O.A., Nature, 274, 398, 1978; Hinnen, A., Hicks, J.B. and Fink, G.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929, 1978). Ngoài ra, vi khuẩn Coryneform cũng có thể được biến nạp bằng phương pháp xung điện (công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 2-207791) hoặc bằng phương pháp chuyển bằng cách tiếp hợp (Biotechnology (NY). 1991 January; 9(1):84-7).

Số bản sao của gen *bca* cũng có thể được gia tăng bằng cách hợp nhất

nhiều bản sao của gen *bca* vào ADN nhiễm sắc thể của vi khuẩn Coryneform, mà có thể được hoàn thành bằng cách tái tổ hợp tương đồng. Kỹ thuật này được tiến hành bằng cách nhằm vào trình tự mà có mặt trong nhiều bản sao trên ADN nhiễm sắc thể. Các trình tự này có thể bao gồm ADN lặp đi lặp lại hoặc biến đổi lặp lại có ở đầu cuối của nguyên tố có thể đổi chỗ. Theo cách khác, như được bộc lộ trong công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 2-109985, nhiều bản sao của gen *bca* có thể được đưa vào ADN nhiễm sắc thể bằng cách kết hợp chúng thành transposon, và chuyển transposon (công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 2-109985, 7-107976; Mol. Gen. Genet., 245, 397-405, 1994; Plasmit, 2000 November; 44(3): 285-91).

Cũng có thể hiểu được là phương pháp chèn gen *bca* vào plasmit có nguồn gốc sao chép mà không thể sao chép trong vật chủ, hoặc plasmit có nguồn gốc sao chép mà không thể sao chép trong vật chủ và khả năng gây ra sự chuyển bằng cách tiếp hợp với vật chủ, và đưa plasmit thu được vào vật chủ để khuếch đại gen trên nhiễm sắc thể. Các ví dụ về plasmit này bao gồm pSUP301 (Simo và cộng sự, Bio/Technology 1, 784-791, 1983), pK18mob hoặc pK19mob (Schaefer và cộng sự, Gene, 145, 69-73, 1994), pGEM-T (Promega Corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman, Journal of Biological Chemistry, 269:32678-84, 1994; patent Mỹ số 5.487.993), pCR Blunt (Invitrogen, Groningen, Netherlands; Bernard và cộng sự, Journal of Molecular Biology, 234: 534-541, 1993), pEM1 (Schrumpf và cộng sự, Journal of Bacteriology, 173:4510-4516, 1991), pBGS8 (Spratt và cộng sự, Gene, 41:337-342, 1986), và v.v.. Vectơ plasmit bao gồm gen *bca* được chuyển vào vi khuẩn Coryneform bằng cách tiếp hợp hoặc biến nạp để chuyển gen vào nhiễm sắc thể. Phương pháp tiếp hợp được mô tả ví dụ bởi Schaefer và cộng sự (Applied and Environmental Microbiology, 60, 756-759, 1994). Phương pháp biến nạp ví dụ được mô tả bởi Theirbach và cộng sự (Applied Microbiology và Biotechnology, 29, 356-362, 1988), Dunican and Shivinan (Bio/Technology 7, 1067-1070, 1989), và Tauch và cộng sự (FEMS Microbiological Letters, 123, 343-347, 1994).

Hoạt tính của *bca* cũng có thể được tăng cường bằng cách thay thế trình tự kiểm soát sự biểu hiện tự nhiên, như đoạn khởi đầu của gen *bca*, trên ADN nhiễm sắc thể hoặc plasmit với gen khởi đầu mạnh hơn. Các phương pháp khác bao gồm bước cải biến yếu tố tham gia vào việc kiểm soát sự biểu hiện gen *bca*,

như gen điều khiển hoặc gen kìm hãm, hoặc thắt gen kết thúc mạnh (Hamilton và cộng sự, Journal of Bacteriology 171:4617-4622). Ví dụ, đoạn khởi đầu lac, đoạn khởi đầu trp, đoạn khởi đầu trc, đoạn khởi đầu PS2, và v.v., được biết là các đoạn khởi đầu mạnh. Các phương pháp đánh giá độ mạnh của đoạn khởi đầu và các ví dụ về các đoạn khởi đầu mạnh được mô tả trong giấy Goldstein và cộng sự (Prokaryotic Promoters in Biotechnology, Biotechnol. Annu. Rev., 1, 105-128, 1995), và v.v.. Ngoài ra, như được bộc lộ trong WO00/18935, độ mạnh của đoạn khởi đầu có thể được gia tăng bằng cách tạo ra một vài thay thế nucleotit trong vùng đoạn khởi đầu của gen đích để tạo ra trình tự sát với trình tự đồng nghĩa. Ví dụ, vùng -35 có thể được thay bằng TTGACA hoặc TTGCCA, và vùng -10 có thể được thay bằng TATAAT hoặc TATAAC. Ngoài ra, đã biết là hiệu quả dịch mã của mRNA bị ảnh hưởng đáng kể bởi việc thay thế một số nucleotit trong vùng đệm giữa vị trí gắn kết ribosom (RBS) và codon mở đầu dịch mã, cụ thể, trình tự ở ngay trước codon mở đầu, và chúng có thể được cải biến.

Các ví dụ về vùng trước của gen *bca*, ví dụ, bao gồm vùng các số nucleotit 1 đến 561 của SEQ ID NO: 11. Trình tự kiểm soát biểu hiện như đoạn khởi đầu trước gen *bca* cũng có thể được nhận ra bằng cách sử dụng vectơ tra cứu đoạn khởi đầu hoặc phần mềm phân tích gen như GENETYX. Bằng cách thay thế hoặc cải biến đoạn khởi đầu như được mô tả ở trên, sự biểu hiện gen *bca* được gia tăng. Sự thay thế trình tự kiểm soát biểu hiện có thể đạt được ví dụ bằng cách sử dụng plasmit nhạy nhiệt. Sự cải biến trình tự kiểm soát biểu hiện có thể kết hợp với sự gia tăng số bản sao của gen *bca*.

Sự gia tăng lượng biểu hiện cũng có thể đạt được bằng cách kéo dài thời gian sống sót của mRNA hoặc ngăn ngừa sự phân hủy của protein được mã hóa trong các tế bào.

Như các gen mã hóa cacbonic anhydraza của *Escherichia coli*, các gen *yadF* và *cynT* mã hóa hai loại cacbonic anhydraza, lần lượt Can (cacbonic anhydraza 2) và CynT (cacbonic anhydraza 1) đã được báo cáo, và các gen này cũng có thể được sử dụng thay cho gen *bca* nêu trên. Như *yadF*, *yadF* của *Escherichia coli* đăng ký tại ngân hàng gen (mã truy cập EG_12319) được lấy ví dụ. Trình tự nucleotit của gen này được thể hiện là SEQ ID NO: 27 (vùng mã hóa: 201 đến 860), và trình tự axit amin được mã hóa được thể hiện là SEQ ID

NO: 28. Như gen *cynT*, *cynT* của *Escherichia coli* (mã truy cập EG_10176) được lấy ví dụ. Trình tự nucleotit của gen *cynT* này được thể hiện là SEQ ID NO: 29 (vùng mã hóa: 201 đến 857), và trình tự axit amin được mã hóa được thể hiện là SEQ ID NO: 30. Gen mã hóa protein giống 80% hoặc cao hơn, tốt hơn là 90% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa 95% hoặc cao hơn, đặc biệt tốt hơn là 97% hoặc cao hơn toàn bộ chiều dài của bất kỳ trình tự nào trong số các trình tự axit amin này, và có hoạt tính của cacbonic anhydraza cũng có thể được sử dụng.

Vi sinh vật được sử dụng cho phương pháp sản xuất theo sáng chế có thể là vi sinh vật cải biến để truyền hoạt tính của D-xyloza-5-phosphat phosphoketolaza và/hoặc hoạt tính của fructoza-6-phosphat phosphoketolaza ngoài gia tăng hoạt tính của cacbonic anhydraza.

Hoặc một hoặc cả hai hoạt tính của D-xyloza-5-phosphat phosphoketolaza và hoạt tính của fructoza-6-phosphat phosphoketolaza có thể được truyền. Trong phần mô tả này, D-xyloza-5-phosphat phosphoketolaza và fructoza-6-phosphat phosphoketolaza có thể được gọi chung là phosphoketolaza.

Hoạt tính của D-xyloza-5-phosphat phosphoketolaza có nghĩa là hoạt tính để chuyển hóa xyloza-5-phosphat thành glyxelaldehyt-3-phosphat và axetyl phosphat với sự tiêu thụ axit phosphoric để giải phóng một phân tử H_2O. Hoạt tính này có thể được đo bằng phương pháp được mô tả bởi Goldberg, M. và cộng sự (Methods Enzymol., 9, 515-520, 1996) hoặc bằng phương pháp được mô tả bởi L. Meile (J. Bacteriol., 183:2929-2936, 2001).

Hoạt tính của fructoza-6-phosphat phosphoketolaza có nghĩa là hoạt tính để chuyển hóa fructoza-6-phosphat thành erythroza-4-phosphat và axetyl phosphat với sự tiêu thụ axit phosphoric để giải phóng một phân tử H_2O. Hoạt tính này có thể được xác định bằng phương pháp được mô tả bởi Racker, E. (Methods Enzymol., 5, 276-280, 1962) hoặc bằng phương pháp được mô tả bởi L. Meile (J. Bacteriol., 183:2929-2936, 2001).

Hoạt tính phosphoketolaza có thể được truyền bằng cách đưa gen mã hóa phosphoketolaza vào các tế bào vi khuẩn Coryneform bằng cách sử dụng plasmit, bằng cách kết hợp gen này vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn Coryneform, hoặc tương tự.

Vi khuẩn Coryneform vốn không có hoạt tính của phosphoketolaza,

nhưng hoạt tính của phosphoketolaza có thể được truyền bằng cách đưa plasmit chứa gen mã hóa phosphoketolaza có nguồn gốc từ sinh vật khác vào các tế bào vi khuẩn Coryneform, nhờ việc kết hợp gen mã hóa phosphoketolaza có nguồn gốc từ sinh vật khác vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn Coryneform, hoặc tương tự.

Gen mã hóa D-xyloza-5-phosphat phosphoketolaza có thể thu được bằng PCR sử dụng ADN nhiễm sắc thể của vi sinh vật có hoạt tính của D-xyloza-5-phosphat phosphoketolaza làm khuôn, hoặc tương tự. Các ví dụ về vi sinh vật này bao gồm vi khuẩn như vi khuẩn axit lactic, vi khuẩn đồng hóa metanol, vi khuẩn đồng hóa metan, vi khuẩn thuộc chủng *Streptococcus*, *Axetobacter*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Thiobacillus*, *Metylococcus*, *Butyrivibrio*, *Fibrobacter* hoặc tương tự; các nấm men thuộc chủng *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Pichia*, *Yarrowia*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Trichosporon*, *Wingea*, hoặc tương tự, v.v.

Gen mã hóa fructoza-6-phosphat phosphoketolaza có thể thu được bằng PCR sử dụng ADN nhiễm sắc thể của vi sinh vật có hoạt tính của fructoza-6-phosphat phosphoketolaza làm khuôn, hoặc tương tự. Các ví dụ về vi sinh vật này bao gồm vi khuẩn thuộc chủng *Axetobacter*, *Bifidobacterium*, *Chlorobium*, *Brucella*, *Metylococcus*, *Gardnerella*, hoặc tương tự; các nấm men thuộc chủng *Candida*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, hoặc tương tự, v.v..

Ví dụ cụ thể về gen mã hóa D-xyloza-5-phosphat phosphoketolaza bao gồm gen *xpkA* mã hóa D-xyloza-5-phosphat phosphoketolaza của *Lactobacillus pentosus* MD363. Trình tự nucleotit của nó được đăng ký tại cơ sở dữ liệu EMBL/ngân hàng gen với số phiên mã AJ309011 (Posthuma, CC. et al, Appl. Environ. Microbiol., 68(2), 831-7, 2002, SEQ ID NO: 15).

Gen xpk1 có nguồn gốc từ *Lactobacillus plantarum* cũng có thể được sử dụng. Trình tự nucleotit của nó được đăng ký tại cơ sở dữ liệu EMBL/ngân hàng gen với số vùng phiên mã NC_004567: trình tự bổ sung (từ 2362936 đến 2365302) (Kleerebezem, M., et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (4), 1990-1995, 2003, SEQ ID NO: 17).

Ngoài ra, các ví dụ về các gen tương đồng của các gen này bao gồm gen của *Lactobacillus plantarum* làm trình tự bổ sung có mã truy cập ngân hàng gen NC_004567 (từ 3169067 đến 3171478), gen của *Streptococcus agalactiae* mã hóa trình tự axit amin của mã truy cập ngân hàng gen NP_736274, gen của

Lactococcus lactis subsp. *Lactis* mã hóa trình tự axit amin của mã truy cập ngân hàng gen NP_267658, gen của *Lactobacillus johnsonii* mà được đăng ký là mã truy cập ngân hàng gen NC_005362 (696462 đến 698867), gen của *Lactobacillus acidophilus* mã hóa trình tự axit amin của mã truy cập ngân hàng gen YP_193510, và v.v..

Gen mã hóa protein có các hoạt tính của cả D-xyloza-5-phosphat phosphoketolaza và fructoza-6-phosphat phosphoketolaza cũng có thể được sử dụng. Các ví dụ về gen này bao gồm gen *xfp* của *Bifidobacterium lactis*. Trình tự nucleotit của nó được đăng ký tại cơ sở dữ liệu EMBL/ngân hàng gen dưới dạng số mã truy cập là AJ293946 (Meile, L. et al, J. Bacteriol., 183(9), 2929-36, 2001, SEQ ID NO: 19).

Như là các gen tương đồng của gen *xfp*, cũng có thể sử dụng gen của *Bifidobacterium longum* mã hóa trình tự axit amin của mã truy cập ngân hàng gen NP_696135, gen của *Chlorobium tepidum* mã hóa trình tự axit amin của mã truy cập ngân hàng gen NP_662409, gen của *Brucella suis* mã hóa trình tự axit amin của mã truy cập ngân hàng gen NP_699578, gen của *Brucella abortus* mã hóa trình tự axit amin của mã truy cập ngân hàng gen YP_223570, và v.v..

Ngoài ra, gen phosphoketolaza có thể là ADN lai với trình tự bổ sung của trình tự bất kỳ trong số các trình tự nucleotit hoặc mẫu dò mà có thể được tạo ra từ trình tự bổ sung dưới các điều kiện nghiêm ngặt, và mã hóa protein có hoạt tính của phosphoketolaza. Ngoài ra, cũng có thể sử dụng ADN mã hóa protein giống 80% hoặc cao hơn, tốt hơn là 90% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa 95% hoặc cao hơn, đặc biệt tốt hơn là 97% hoặc cao hơn với toàn bộ chiều dài của trình tự axit amin SEQ ID NO: 16, 18, hoặc 20, và có hoạt tính của phosphoketolaza.

Vi sinh vật được sử dụng cho phương pháp sản xuất theo sáng chế có thể là vi sinh vật cải biến để gia tăng hoạt tính của phosphotransaxetylaza so với chủng hoang dại, ngoài tăng cường hoạt tính của cacbonic anhydraza. Phosphotransaxetylaza là enzym tham gia trao đổi chất axit axetic. Ở *Escherichia coli*, nó chịu trách nhiệm về phản ứng mà tạo ra axetyl phosphat từ axit phosphoric và axetyl-CoA, mà là một phần của con đường chính sinh ra axit axetic. Mặt khác, đã biết rằng, ở *Corynebacterium glutamicum*, hoạt tính của phosphotransaxetylaza gia tăng khi axit axetic được đồng hóa, và axetyl-CoA

được sinh ra. Ngoài ra, cũng đã biết rằng RamB, mà là yếu tố phiên mã, được tham gia trong việc kiểm soát âm tính hoạt tính của phosphotransaxetylaza (Microbiology, 145, 503-513, 1999; Journal of Bacteriology, 186, 9, 2798-2809, 2004). Hoạt tính của phosphotransaxetylaza có thể được tăng cường bằng cách gia tăng số bản sao của gen mã hóa phosphotransaxetylaza, cải biến đoạn khởi đầu của gen mã hóa phosphotransaxetylaza, hoặc tương tự, như trong trường hợp gia tăng hoạt tính của phosphotransaxetylaza nêu trên. Ngoài ra, sự gia tăng cũng có thể đạt được bằng cách xóa gen *ramB* nêu trên, hoặc cải biến vị trí gắn kết protein RamB nằm trước gen mã hóa phosphotransaxetylaza.

Như là gen mã hóa phosphotransaxetylaza (gen *pta*) của vi khuẩn Coryneform, trình tự nucleotit NCgl2657 của ATCC 13032 đăng ký tại ngân hàng gen (sợi bổ sung từ 2936506 đến 2937891 của mã truy cập NC 003450.3) có thể được sử dụng. Trình tự nucleotit của gen này lần lượt được thể hiện là SEQ ID NO: 21, và trình tự axit amin được mã hóa được thể hiện là SEQ ID NO: 22. Ngoài ra, trình tự nucleotit của gen *pta* của chủng *C. glutamicum* ATCC 13869 được thể hiện là các số nucleotit từ 1214 đến 2641 trong SEQ ID NO: 23, và trình tự axit amin mã hóa bằng gen được thể hiện là SEQ ID NO: 24.

Ngoài ra, như là gen của sáng chế, gen tương đồng của gen *pta* có nguồn gốc từ vi sinh vật khác có thể được sử dụng miễn là nó mã hóa protein thể hiện hoạt tính của phosphotransaxetylaza trong vi khuẩn Coryneform. Gen tương đồng này của gen *pta* có thể được tra cứu bằng cách sử dụng BLAST (http://blast.genome.jp/) hoặc tương tự dựa vào trình tự nucleotit của các nucleotit từ số 1214 đến 2641 của SEQ ID NO: 23.

Trình tự nucleotit của gen *pta* mà có thể được sử dụng cho sáng chế đã được làm sáng tỏ. Do đó, vùng chứa gen *pta* và trình tự kiểm soát sự biểu hiện của nó có thể thu được bằng PCR (phản ứng chuỗi polymeraza, gọi là White, T.J. và cộng sự, Trends Genet. 5, 185, 1989) sử dụng các đoạn mồi được tạo ra trên cơ sở trình tự nucleotit đã biết, ví dụ, các đoạn mồi SEQ ID NO: 25 và 26, và ADN nhiễm sắc thể của vi khuẩn Coryneform làm khuôn. Gen tương đồng của gen *pta* có nguồn gốc từ vi sinh vật khác cũng có thể thu được theo cách tương tự.

Trình tự nucleotit của gen *pta* có thể khác nhau tùy thuộc vào loài hoặc chủng vi khuẩn Coryneform, gen *pta* được sử dụng cho sáng chế không bị giới

hạn ở trình tự nucleotit của các số nucleotit từ 1214 đến 2641 của SEQ ID NO: 23 hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 21, và nó có thể là gen đột biến hoặc gen được cải biến nhân tạo mã hóa protein có trình tự SEQ ID NO: 24 hoặc 22, mà bao gồm các thay thế, xóa, chèn, bổ sung, v.v., một hoặc một vài gốc axit amin ở một hoặc nhiều vị trí miễn là protein được mã hóa có chức năng của protein *Pta*, hoạt tính của phosphotransaxetylaza. Mặc dù số là thuật ngữ "một hoặc một vài" có thể khác nhau tùy thuộc vào các vị trí trong cấu trúc không gian ba chiều của protein hoặc các loại gốc axit amin, cụ thể, giá trị này có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 20, tốt hơn là từ 1 đến 10, tốt hơn nữa là từ 1 đến 5. Các thay thế, xóa, chèn, bổ sung, đảo gốc axit amin hoặc tương tự mô tả ở trên cũng có thể bao gồm các loại do đột biến xuất hiện tự nhiên trên cơ sở các khác nhau riêng biệt, các khác nhau về loài vi sinh vật chứa gen *pta* (đột biến hoặc biến dị), hoặc tương tự.

Hơn nữa, ADN mã hóa protein giống không dưới 80%, tốt hơn là không dưới 90%, tốt hơn nữa không dưới 95%, đặc biệt tốt hơn là không dưới 97% với toàn bộ trình tự axit amin SEQ ID NO: 24 hoặc 22, và có hoạt tính của phosphotransaxetylaza cũng có thể được sử dụng.

Vi khuẩn Coryneform được sử dụng cho phương pháp sản xuất theo sáng chế có thể là vi sinh vật cải biến để gia tăng hoạt tính của pyruvat carboxylaza so với chủng hoang dại, ngoài các cải biến nêu trên. Như là gen pyruvat carboxylaza, ví dụ, các gen có nguồn gốc từ vi khuẩn Coryneform và vi khuẩn *Bacillus* có thể được sử dụng, và gen *pyc* của chủng *C. glutamicum* ATCC 13032 (mã truy cập ngân hàng gen NCgl0659) và gen *pyc* của *B. subtilis* (patent Châu Âu số 1092776) có thể được sử dụng.

Vi khuẩn Coryneform được sử dụng cho phương pháp sản xuất theo sáng chế có thể là vi khuẩn cải biến để gia tăng hoạt tính phosphoenolpyruvat carboxylaza so với chủng hoang dại, ngoài các cải biến nêu trên. Như là gen phosphoenolpyruvat carboxylaza, ví dụ, các gen có nguồn gốc từ vi khuẩn Coryneform và vi khuẩn *Escherichia* có thể được sử dụng, và gen *ppc* của chủng *C. glutamicum* ATCC 13032 (mã truy cập ngân hàng gen NCgl1523) và gen *ppc* có nguồn gốc từ chủng *E. Coli* MG1655 (mã truy cập ngân hàng gen NP_418391) có thể được sử dụng.

Do phosphoenolpyruvat carboxylaza có thể chịu sự ức chế hồi tiếp bởi

axit aspartic, tốt hơn là cải biến sao cho enzym này được khử nhạy với sự ức chế hồi tiếp bởi axit aspartic (patent Châu Âu số 0723011).

<2> Phương pháp sản xuất axit amin dạng L

Axit amin dạng L có thể được sản sinh bằng cách nuôi cấy vi khuẩn Coryneform thu được như được mô tả ở trên trong môi trường để sản sinh và tích tụ axit amin dạng L trong môi trường này, và thu axit amin dạng L từ môi trường này.

Môi trường điển hình chứa nguồn cacbon, nguồn nitơ, và các muối khoáng cũng như các chất dinh dưỡng vi lượng hữu cơ như các axit amin và các vitamin cần thiết có thể được sử dụng làm môi trường được sử dụng cho việc nuôi cấy. Có thể sử dụng hoặc môi trường tổng hợp hoặc môi trường tự nhiên. Bất kỳ loại nguồn cacbon và nguồn nitơ nào cũng có thể được sử dụng cho môi trường miễn là chúng có thể được tận dụng bởi chủng được chọn để nuôi cấy.

Các đường như glucoza, glyxerol, fructoza, sucroza, maltoza, manoza, galactoza, các hydrolysat tinh bột và các molaza có thể được sử dụng làm nguồn cacbon. Ngoài ra, các axit hữu cơ như axit axetic và axit xitric, và các rượu như etanol cũng có thể được sử dụng đơn lẻ hoặc kết hợp với các nguồn cacbon khác. Amoniac, các muối amoni như amoni sulfat, amoni cacbonat, amoni clorua, amoni phosphat và amoni axetat, các muối axit nitric và v.v. có thể được sử dụng làm nguồn nitơ. Các axit amin, các vitamin, các axit béo, các axit nucleic, các nguyên tố chứa các chất dinh dưỡng chứa các chất như pepton, axit casamin, dịch chiết nấm men, và sản phẩm phân hủy protein đậu nành, và v.v. có thể được sử dụng làm các chất dinh dưỡng vi lượng hữu cơ. Khi chủng đột biến dinh dưỡng sinh trưởng cần axit amin hoặc tương tự cho sự phát triển của nó được sử dụng, chất dinh dưỡng cần thiết tốt hơn được bổ sung. Các muối axit phosphoric, các muối magie, các muối canxi, các muối sắt, các muối mangan và v.v. có thể được sử dụng làm các muối vô cơ.

Việc nuôi cấy có thể được tiến hành dưới dạng môi trường nuôi cấy hiếu khí, trong khi nhiệt độ lên men tốt hơn được điều chỉnh đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20 đến 45°C, và độ pH nằm trong khoảng từ 3 đến 9. Khi độ pH giảm trong khi nuôi cấy, canxi cacbonat có thể được bổ sung, hoặc môi trường được trung hòa bằng chất kiềm như khí amoniac. Axit amin dạng L đích như axit L-glutamic được tích tụ với lượng đáng kể trong môi trường nuôi cấy, ví dụ sau 10

đến 120 giờ nuôi cấy dưới các điều kiện này như được mô tả ở trên.

Ngoài ra, khi axit L-glutamic được sản sinh, việc nuôi cấy có thể được thực hiện bằng cách kết tủa axit L-glutamic trong môi trường bằng cách sử dụng môi trường lỏng làm môi trường được điều chỉnh để thỏa mãn điều kiện mà dưới điều kiện này axit L-glutamic được kết tủa. Các ví dụ về các điều kiện mà dưới các điều kiện này axit L-glutamic được kết tủa, ví dụ, bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 4,0, tốt hơn là độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 4,0, tốt hơn nữa độ pH nằm trong khoảng từ 4,3 đến 4,0, đặc biệt tốt hơn độ pH = 4,0 (công bố đơn patent Châu Âu không xét nghiệm số 1078989).

Việc thu gom axit amin dạng L từ môi trường nuôi cấy sau khi nuôi cấy có thể được thực hiện bằng phương pháp thu gom đã biết. Ví dụ, sau khi các tế bào được loại bỏ từ môi trường nuôi cấy, axit amin dạng L có thể được thu gom bằng cách cô môi trường để kết tinh axit amin dạng L, sắc ký trao đổi ion, hoặc tương tự. Khi việc nuôi cấy được thực hiện dưới các điều kiện này mà axit L-glutamic được kết tủa, axit L-glutamic kết tủa trong môi trường có thể được thu gom bằng cách ly tâm hoặc lọc. Trong trường hợp này, axit L-glutamic hòa tan trong môi trường có thể được kết tinh và sau đó tách khỏi nhau bằng axit L-glutamic đã kết tủa.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được giải thích cụ thể dựa vào ví dụ. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ sau đây.

1. Thiết kế chủng *C. glutamicum* ATCC 13869 được khuếch đại bởi *bca*

Chủng thiếu hụt *sucA* được sử dụng làm chủng cha mẹ để khuếch đại gen *bca*. Chủng thiếu hụt *sucA* có thể được thiết kế bằng phương pháp mô tả dưới đây.

(1-1) Thiết kế chủng thiếu hụt *sucA*

Chủng thiếu hụt *sucA* của ATCC 13869 (ATCC13869ΔsucA) được thiết kế như sau.

Gen *sucA* mã hóa phân đoạn Elo của α-ketoglutarat dehydrogenaza bị phá vỡ bằng cách sử dụng plasmit pBS3 mang gen *sacB* mã hóa levan sucraza. Để thiết kế vectơ mang *sacB* để phá vỡ gen, pBS3 được mô tả trong các công bố đơn quốc tế số WO2005/113745 và WO2005/113744 được sử dụng.

Đoạn gen bao gồm *sucA* có nguồn gốc từ chủng *C. glutamicum* ATCC 13869, nhưng thiếu ORF thu được bằng cách chồng lên PCR sử dụng, làm các đoạn mồi, các ADN tổng hợp chỉ ra dựa vào trình tự nucleotit của gen của *C. glutamicum* ATCC 13032 (SEQ ID NO: 9, mã truy cập cơ sở dữ liệu ngân hàng gen NC_003450) đã được mở ra công khai. Cụ thể, PCR được tiến hành theo cách thông thường với ADN nhiễm sắc thể của chủng *C. glutamicum* ATCC 13869 làm khuôn và các ADN tổng hợp của các trình tự SEQ ID số: 1 và 2 làm các đoạn mồi để thu được sản phẩm khuếch đại của phía đầu cuối N của gen *sucA*. Một cách riêng biệt, để thu được sản phẩm khuếch đại của phía đầu cuối C của gen *sucA*, PCR được tiến hành theo cách thông thường với ADN bộ gen của chủng *C. glutamicum* ATCC 13869 làm khuôn và các ADN tổng hợp của các trình tự SEQ ID NO: 3 và 4 làm các đoạn mồi. Các trình tự nucleotit của các trình tự SEQ ID NO: 2 và 3 được bổ sung cho nhau, và có cấu trúc *sucA* thiếu hụt toàn bộ trình tự ORF .

Sau đó, để thu được đoạn gen *sucA* thiếu hụt trình tự bên trong, lượng tương đương của các sản phẩm gen nêu trên của các phía đầu cuối N và đầu cuối C của *sucA* được trộn lẫn, và sử dụng làm khuôn để thực hiện phương pháp PCR được tiến hành theo cách thông thường với các ADN tổng hợp của trình tự SEQ ID NO: 5 và 6 làm các đoạn mồi và nhờ đó thu được sản phẩm khuếch đại gen *sucA* đưa vào bằng đột biến. Sản phẩm PCR tạo ra được làm sạch theo cách thông thường và sau đó được phân cắt bằng *Bam*HI, và sản phẩm thu được được chèn vào pBS3 nêu trên ở vị trí *Bam*HI. Các tế bào khả biến của *Escherichia coli* JM109 (Takara Bio) được biến nạp bằng ADN thu được, được đặt trên môi trường đĩa LB chứa 100μM IPTG, 40μg/ml X-Gal và 25μg/ml Km, và nuôi cấy qua đêm, và các khuẩn lạc màu trắng xuất hiện được gom lại, và tách thành từng khuẩn lạc riêng lẻ để thu được các thể biến nạp. Các plasmit được chiết từ các thể biến nạp thu được, và plasmit mà sản phẩm PCR đích được chèn vào đó được đặt là pBS3ΔsucA.

(1-2) Thiết kế chủng thiếu hụt *sucA*

pBS3ΔsucA thu được trong (1-1) nêu trên không chứa bất kỳ vùng cho phép sao chép tự động plasmit trong các tế bào vi khuẩn Coryneform. Do đó, khi vi khuẩn Coryneform được biến nạp với plasmit này, chủng trong đó plasmit này được kết hợp vào nhiễm sắc thể bằng cách tái tổ hợp tương đồng xuất hiện dưới

dạng thể biến nạp mặc dù nó xuất hiện ở tần số thấp. Chủng C. *glutamicum* ATCC 13869 được biến nạp bằng phương pháp xung điện sử dụng plasmit pBS3ΔsucA ở nồng độ cao, được sử dụng trên môi trường đĩa CM-Dex (5g/l glucoza, 10g/l polypepton, 10g/l dịch chiết nấm men, 1g/l KH_2PO_4, 0,4g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01g/l $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01g/l $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, 3g/l ure, 1,2g/l hydrolysat đậu nành, 10µg/l biotin, 15g/l thạch, được điều chỉnh đến độ pH = 7,5 bằng NaOH) chứa 25µg/ml kanamyxin, và nuôi cấy ở nhiệt độ 31,5°C trong thời gian khoảng 30 giờ. Chủng phát triển trên môi trường này là chủng trong đó gen kháng kanamyxin và gen *sacB* có nguồn gốc plasmit được chèn vào hệ gen, kết quả là sự tái tổ hợp tương đồng giữa đoạn gen *sucA* của plasmit và gen đó trên hệ gen của chủng ATCC 13869.

Sau đó, các thể tái tổ hợp thứ nhất này được nuôi cấy qua đêm ở nhiệt độ 31,5°C trong môi trường lỏng CM-Dex (được tạo ra bằng các thành phần của môi trường đĩa CM-Dex ngoại trừ thạch) không chứa kanamyxin, môi trường được pha loãng một cách phù hợp và được sử dụng cho môi trường Dex-S10 chứa sucroza 10% (100g/l sucroza, 10g/l polypepton, 10g/l dịch chiết nấm men, 1g/l KH_2PO_4, 0,4g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01g/l $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01g/l $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 3g/l ure, 1,2g/l hydrolysat đậu nành, 10µg/l biotin, 15g/l thạch, được điều chỉnh đến độ pH = 7,5 bằng KOH) không chứa kanamyxin, và việc nuôi cấy được tiến hành ở nhiệt độ 31,5°C trong thời gian khoảng 30 giờ. Kết quả là, có thể thu được các chủng được đánh giá là trở nên không nhạy cảm với sucroza do loại trừ gen *sacB* thu được từ sự tái tổ hợp tương đồng thứ hai.

Các chủng thu được như mô tả ở trên bao gồm các chủng trong đó gen *sucA* được thay bằng gen loại đột biến có nguồn gốc từ pBS3ΔsucA và các chủng trong đó gen *sucA* được quay trở lại chủng hoang dại. Dù gen *sucA* là gen loại đột biến hoặc loài hoang dại có thể dễ dàng được xác định bằng cách trực tiếp sử dụng các tế bào thu được bằng cách nuôi cấy trên môi trường đĩa Dex-S10 đối với PCR để phát hiện gen *sucA*. Các chủng mà tạo ra sản phẩm PCR nhỏ hơn các chủng thu được với ADN nhiễm sắc thể của chủng ATCC 13869 được sử dụng làm khuôn trong phép phân tích sử dụng các đoạn mồi để khuếch đại PCR gen *sucA* (các trình tự SEQ ID NO: 5 và 6) được sử dụng làm chủng thiếu hụt *sucA* trong các thí nghiệm sau đây.

Khả năng sản sinh axit L-glutamic của các chủng thiếu hụt *sucA* được

đánh giá theo phương pháp sau đây. Các chủng được nuôi cấy trên môi trường đĩa CM-Dex, và các chủng phát triển trong mỗi môi trường nuôi cấy ở nhiệt độ 31,5°C cùng với lắc trong 20ml môi trường chứa 30g sucroza, 1g KH_2PO_4, 0,4g $MgSO_4$, 15g $(NH_4)_2SO_4$, 0,01g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01g $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, 13,7ml hydrolysat đậu nành, 200µg thiamin hydroclorua, 300µg biotin, và 50g $CaCO_3$ trong 1 l nước cất (pH được điều chỉnh đến 8,0 bằng KOH) chứa trong bình thót cổ Sakaguchi. Khi tất cả glucoza trong môi trường được tiêu thụ, sự nuôi cấy kết thúc. Nồng độ axit L-glutamic được đo đối với chất nổi bề mặt trong dịch nuôi cấy được pha loãng thích hợp bằng nước sử dụng Biotech Analyzer (AS-210, Sakura SI). Chủng mà thể hiện hiệu suất lên men axit L-glutamic cao được chọn và chỉ định là ATCC13869ΔsucA.

(1-3) Thiết kế plasmit để khuếch đại *bca*

Để thiết kế chủng trong đó sự biểu hiện của gen cacbonic anhydraza (*bca*) được gia tăng, vectơ con thoi pVK9 được xử lý bằng *Bam*HI, sản phẩm thu được được cắt bằng đoạn ADN mã hóa enzyme (thu được bằng cách khuếch đại bằng PCR sử dụng các trình tự SEQ ID NO: 7 và 8 làm các đoạn mồi và ADN nhiễm sắc thể của chủng *C. glutamicum* ATCC 13869 làm khuôn, và xử lý bằng *Bam*HI), sản phẩm cắt được sử dụng để biến nạp các tế bào khả biến của *Escherichia coli* JM109 (Takara Bio), và các tế bào được sử dụng trên môi trường đĩa LB chứa 100µM IPTG, 40µg/ml X-Gal và 25µg/ml Cm, và nuôi cấy qua đêm. Sau đó, các khuẩn lạc màu trắng xuất hiện được gom lại, và tách thành các khuẩn lạc riêng để thu được các thể biến nạp. Các plasmit được chiết từ các thể biến nạp thu được, và plasmit trong đó gen *bca* được cắt theo hướng tiến tương ứng với gen *lacZ* được chỉ định là pVK9-bca.

pVK9 là vectơ con thoi thu được bằng cách cắt thành đầu bằng vị trí *Ava*II của pHSG299 (Takara Bio) và chèn đoạn, mà thu được bằng cách cắt xén vùng pHK4 (công bố đơn Nhật không xét nghiệm số 05-007491) có thể sao chép tự động trong vi khuẩn Coryneform với *Bam*HI và *Kpn*I, và cắt thành đầu bằng vùng này, thành vị trí đầu bằng của pHSG299.

Các ADN tổng hợp của các trình tự SEQ ID NO: 7 và 8 có thể được chỉ ra dựa vào trình tự nucleotit của gen cacbonic anhydraza của *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 đã được công khai (mã truy cập dữ liệu ngân hàng gen NC_003450, trình tự SEQ ID NO: 13).

(1-4) Đưa plasmit để khuếch đại *bca* vào chủng ATCC13869ΔsucA

Các chủng thu được bằng cách biến nạp chủng ATCC13869ΔsucA với pVK9 (plasmit để đối chứng) và pVK9-bca (plasmit để khuếch đại *bca*). Sự biến nạp được tiến hành bằng phương pháp xung điện, và các tế bào được sử dụng trên môi trường đĩa CM-Dex chứa 25μg/ml kanamyxin, và nuôi cấy ở nhiệt độ 31,5°C trong thời gian khoảng 30 giờ để thu được các thể biến nạp. Các chủng được đưa với mỗi plasmit nêu trên được chỉ định là ATCC13869ΔsucA(pVK9) và ATCC13869ΔsucA(pVK9-bca).

2. Khẳng định hiệu quả gia tăng sự tích tụ axit L-glutamic trong chủng ATCC13869ΔsucA tăng cường *bca*

Hiệu quả khuếch đại *bca* được đánh giá bằng cách sử dụng hệ thống đánh giá sự nuôi cấy trong bình thót cổ đã nêu ở mục (1-2).

(2-1) Sự tích tụ axit glutamic được quan sát với chủng gia tăng *bca*

Ảnh hưởng của sự gia tăng *bca* đối với sự cải thiện tích tụ axit L-glutamic được đánh giá bằng chủng *C. glutamicum* ATCC13869ΔsucA(pVK9) và ATCC13869ΔsucA(pVK9-*bca*) bằng cách nuôi cấy theo cùng cách như cách được sử dụng để đánh giá chủng thiếu hụt *sucA* được mô tả trong (1-2) nêu trên. Các kết quả thu được sau khi nuôi cấy trong thời gian 12 giờ được thể hiện trong bảng sau đây. Rõ ràng là lượng tích tụ của axit L-glutamic là cao hơn đối với chủng gia tăng *bca* so với chủng đối chứng (n = 4).

Bảng 1

	Tích tụ axit L-glutamic sau khi nuôi cấy trong thời gian 12 giờ (g/l, trung bình ± độ lệch chuẩn % (n = số mẫu))
ATCC13869ΔsucA(pVK9)	7,1 ± 0,63 (n = 4)
ATCC13869ΔsucA(pVK9-bca)	8,0 ± 0,78 (n = 4)

(2-2) Sự tích tụ axit amin dạng L được quan sát với chủng gia tăng *bca*

Ảnh hưởng của sự gia tăng *bca* đối với sự cải thiện tích tụ axit amin dạng L được đánh giá bằng chủng *C. glutamicum* ATCC13869ΔsucA(pVK9) và ATCC13869ΔsucA(pVK9-bca) bằng cách nuôi cấy theo cùng cách như cách

được sử dụng để đánh giá chủng thiếu hụt *sucA* được mô tả trong (1-2) nêu trên. Một mẫu đối với một trong số các chất nổi trên bề mặt nuôi cấy thu được sau khi nuôi cấy của hai loại chủng trong thời gian 24 giờ được pha loãng 51 lần bằng axit clohydric 0,02 N, và các axit amin dạng L khác nhau trong khi pha loãng được định lượng bằng thiết bị phân tích axit amin (L-8500, Hitachi Co., Ltd.). Các kết quả được thể hiện trên Fig.1. Rõ ràng là các lượng tích tụ của axit L-aspartic và L-alanin được cải thiện bằng cách tăng cường *bca* so với chủng đối chứng (n = 2).

Giải thích danh mục trình tự

SEQ ID NO: 1: Trình tự nucleotit của đoạn mồi để phá vỡ gen *C. glutamicum ATCC 13869 sucA*

SEQ ID NO: 2: Trình tự nucleotit của đoạn mồi để phá vỡ gen *C. glutamicum ATCC 13869 sucA*

SEQ ID NO: 3: Trình tự nucleotit của đoạn mồi để phá vỡ gen *C. glutamicum ATCC 13869 sucA*

SEQ ID NO: 4: Trình tự nucleotit của đoạn mồi để phá vỡ gen *C. glutamicum ATCC 13869 sucA*

SEQ ID NO: 5: Trình tự nucleotit của đoạn mồi để khuếch đại gen *C. glutamicum ATCC 13869 sucA*

SEQ ID NO: 6: Trình tự nucleotit của đoạn mồi để khuếch đại gen *C. glutamicum ATCC 13869 sucA*

SEQ ID NO: 7: Trình tự nucleotit của đoạn mồi để khuếch đại gen *C. glutamicum bca*

SEQ ID NO: 8: Trình tự nucleotit của đoạn mồi để khuếch đại gen *C. glutamicum bca*

SEQ ID NO: 9: Trình tự nucleotit của gen *C. glutamicum ATCC 13869 sucA*

SEQ ID NO: 10: Trình tự axit amin của *C. glutamicum* ATCC 13869 α-KGDH

SEQ ID NO: 11: Trình tự nucleotit của gen *C. glutamicum ATCC 13869 bca*

SEQ ID NO: 12: Trình tự axit amin của *C. glutamicum ATCC 13869 bca*

SEQ ID NO: 13: Trình tự nucleotit của gen *C. glutamicum ATCC 13032 bca*

SEQ ID NO: 14: Trình tự axit amin của *C. glutamicum* ATCC 13032 *bca*

SEQ ID NO: 15: Trình tự nucleotit của gen *Lactobacillus pentosus MD363 xpkA*

SEQ ID NO: 16: Trình tự axit amin của *Lactobacillus pentosus* MD363 XpkA

SEQ ID NO: 17: Trình tự nucleotit của gen *Lactobacillus plantarum xpk1*

SEQ ID NO: 18: Trình tự axit amin của *Lactobacillus plantarum* Xpk1

SEQ ID NO: 19: Trình tự nucleotit của gen *Bifidobacterium lactis xfp*

SEQ ID NO: 20: Trình tự axit amin của *Bifidobacterium lactis* Xfp

SEQ ID NO: 21: Trình tự nucleotit của gen *C. glutamicum* ATCC 13869 *pta*

SEQ ID NO: 22: Trình tự axit amin của *C. glutamicum* ATCC 13869 Pta

SEQ ID NO: 23: Trình tự nucleotit của gen *C. glutamicum* ATCC 13032 *pta*

SEQ ID NO: 24: Trình tự axit amin của *C. glutamicum* ATCC 13032 Pta

SEQ ID NO: 25: Trình tự nucleotit của đoạn mồi để khuếch đại gen *C. glutamicum pta*

SEQ ID NO: 26: Trình tự nucleotit của đoạn mồi để khuếch đại gen *C. glutamicum pta*

SEQ ID NO: 27: Trình tự nucleotit của gen *E. Coli* MG1655 *yadF*

SEQ ID NO: 28: Trình tự axit amin của *E. Coli* MG1655 YadF

SEQ ID NO: 29: Trình tự nucleotit của gen *E. Coli* MG1655 *cynT*

SEQ ID NO: 30: Trình tự axit amin của *E. Coli* MG1655 CynT

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất axit amin dạng L, bao gồm bước muôi cấy vi khuẩn Coryneform có khả năng sản sinh axit amin dạng L trong môi trường để sản sinh và tích tụ axit amin dạng L trong môi trường hoặc trong các tế bào vi khuẩn, và thu axit amin dạng L từ môi trường hoặc các tế bào, trong đó vi khuẩn Coryneform đã nêu đã được cải biến để gia tăng hoạt tính cacbonic anhydraza, trong đó axit amin dạng L được lựa chọn từ nhóm bao gồm axit L-glutamic, L-glutamin, L-prolin, L-arginin, L-leuxin và L-xystein.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hoạt tính của cacbonic anhydraza đã nêu được gia tăng bằng cách gia tăng số bản sao của gen mã hóa cacbonic anhydraza, hoặc bằng cách cải biến trình tự kiểm soát biểu hiện của gen.

3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó gen mã hóa cacbonic anhydraza là ADN bao gồm trình tự nucleotit của các số nucleotit từ 562 đến 1182 của SEQ ID NO: 11, hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 13.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi khuẩn đã được cải biến thêm để truyền hoạt tính D-xyloza-5-phosphat phosphoketolaza và/hoặc hoạt tính fructoza-6-phosphat phosphoketolaza.

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi khuẩn được cải biến thêm để gia tăng hoạt tính phosphotransaxetylaza.

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi khuẩn được cải biến thêm để gia tăng hoạt tính pyruvat carboxylaza.

7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi khuẩn được cải biến thêm để gia tăng hoạt tính phosphoenolpyruvat carboxylaza.

8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi khuẩn Coryneform là *Corynebacterium glutamicum* hoặc *Brevibacterium lactofermentum*.

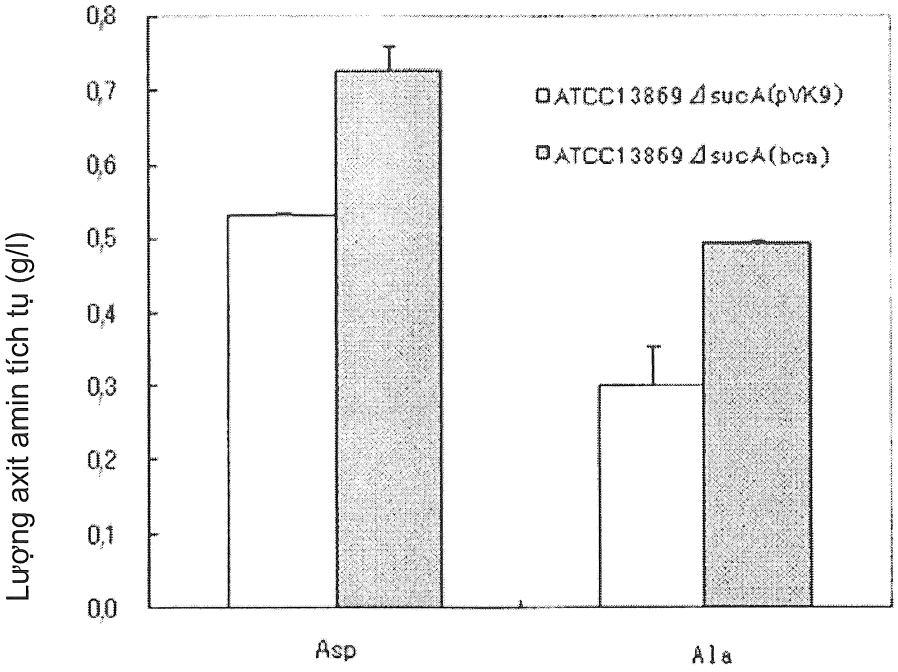

0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
Lượng axit amin tích tụ (g/l)
ATCC13869 ΔsucA(pVK9)
ATCC13869 ΔsucA(bca)
Asp
Ala

Fig. 1

Danh mục trình tự

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> Phương pháp sản xuất axit amin dạng L

<130> D158-10114

<150> JP2009-194636
<151> 2009-08-25

<160> 30

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi

<400> 1
ccaggcactc gtcctcggtt 20

<210> 2
<211> 48
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi

<400> 2
aggctagtgc aggactataa agaccagttc tcctaaaaat aacgtgtc 48

<210> 3
<211> 48
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi

<400> 3
gacacgttat ttttaggaga actggtcttt atagtcctgc actagcct 48

<210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi

<400> 4
tccatcgtgg ccaccgatcc 20

<210> 5
<211> 25
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi

<400> 5
cgggatcccc accggcgtac tcgtg 25

<210> 6
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi

<400> 6
ccacggatcc ttccaatgct attggttg 28

<210> 7
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi

<400> 7
tgcgaggtca ctttttcgct gttcagg 27

<210> 8
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi

<400> 8
gtcgataagc tcttgctttt tcgcagg 27

<210> 9
<211> 4394
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<221> CDS
<222> (443)..(4213)

<400> 9
gtcgacaagc aaaatcgaag cggcagcacg ccgcgtcgga gccttaaacg ccatcgccgc 60
catccctgat ggtttcaatc atcaagtcgg tgaacgcggg cgcaacctgt catccggaca 120
gcgccaactg atcgcgctgg cgcgcgccga actcatcgag ccttccatca tgcttctcga 180
cgaagccacc tccaccctcg accccgccac cgaagccgtt atcctcaacg cctccgatcg 240
agtcactaag ggacgcacca gcatcatcgt cgcgcaccgc ttggcaaccg ctaaaagggc 300
cgaccgtatt cttgttgttg aacaaggacg tatcattgag gacggatctc acgacgcgtt 360
gttgtctgct aacggcacct acgcccgcat gtggcattta atggcctgac acgttatttt 420
taggagaact gtcaacaaat ta atg cta caa ctg ggg ctt agg cat aat cag 472
Met Leu Gln Leu Gly Leu Arg His Asn Gln
1 5 10
cca acg acc aac gtt aca gtg gat aaa ata aag ctc aat aaa ccc tca 520
Pro Thr Thr Asn Val Thr Val Asp Lys Ile Lys Leu Asn Lys Pro Ser
15 20 25
aga agc aag gaa aag agg cga gta cct gcc gtg agc agc gct agt act 568
Arg Ser Lys Glu Lys Arg Arg Val Pro Ala Val Ser Ser Ala Ser Thr
30 35 40
ttc ggc cag aat gcg tgg ctg gta gac gag atg ttc cag cag ttc cag 616
Phe Gly Gln Asn Ala Trp Leu Val Asp Glu Met Phe Gln Gln Phe Gln
45 50 55

```
aag gac ccc aag tcc gtg gac aag gaa tgg aga gaa ctc ttt gag gcg      664
Lys Asp Pro Lys Ser Val Asp Lys Glu Trp Arg Glu Leu Phe Glu Ala
    60                  65                  70
cag ggg gga cca aat gct acc ccc gct aca aca gaa gca cag cct tca      712
Gln Gly Gly Pro Asn Ala Thr Pro Ala Thr Thr Glu Ala Gln Pro Ser
75                  80                  85                  90
gcg ccc aag gag tct gcg aaa cca gca cca aag gct gcc cct gca gcc      760
Ala Pro Lys Glu Ser Ala Lys Pro Ala Pro Lys Ala Ala Pro Ala Ala
                95                  100                 105
aag gca gca ccg cgc gta gaa acc aag ccg gcc gcc aag acc gcc cct      808
Lys Ala Ala Pro Arg Val Glu Thr Lys Pro Ala Ala Lys Thr Ala Pro
            110                 115                 120
aag gcc aag gag tcc tca gtg cca cag caa cct aag ctt ccg gag cca      856
Lys Ala Lys Glu Ser Ser Val Pro Gln Gln Pro Lys Leu Pro Glu Pro
        125                 130                 135
gga caa acc cca atc agg ggt att ttc aag tcc atc gcg aag aac atg      904
Gly Gln Thr Pro Ile Arg Gly Ile Phe Lys Ser Ile Ala Lys Asn Met
    140                 145                 150
gat atc tcc ctg gaa atc cca acc gca acc tcg gtt cgc gat atg cca      952
Asp Ile Ser Leu Glu Ile Pro Thr Ala Thr Ser Val Arg Asp Met Pro
155                 160                 165                 170
gct cgc ctc atg ttc gaa aac cgc gcg atg gtc aac gat cag ctc aag     1000
Ala Arg Leu Met Phe Glu Asn Arg Ala Met Val Asn Asp Gln Leu Lys
                175                 180                 185
cgc acc cgc ggt ggc aag atc tcc ttc acc cac atc att ggc tac gcc     1048
Arg Thr Arg Gly Gly Lys Ile Ser Phe Thr His Ile Ile Gly Tyr Ala
            190                 195                 200
atg gtg aag gca gtc atg gct cac ccg gac atg aac aac tcc tac gac     1096
Met Val Lys Ala Val Met Ala His Pro Asp Met Asn Asn Ser Tyr Asp
        205                 210                 215
gtc atc gac ggc aag cca acc ctg atc gtg cct gag cac atc aac ctg     1144
Val Ile Asp Gly Lys Pro Thr Leu Ile Val Pro Glu His Ile Asn Leu
    220                 225                 230
ggc ctt gcc atc gac ctt cct cag aag gac ggc tcc cgc gca ctt gtc     1192
Gly Leu Ala Ile Asp Leu Pro Gln Lys Asp Gly Ser Arg Ala Leu Val
235                 240                 245                 250
gta gca gcc atc aag gaa acc gag aag atg aac ttc tcc gag ttc ctc     1240
Val Ala Ala Ile Lys Glu Thr Glu Lys Met Asn Phe Ser Glu Phe Leu
                255                 260                 265
gca gca tac gaa gac atc gtg aca cgc tcc cgc aag ggc aag ctc acc     1288
Ala Ala Tyr Glu Asp Ile Val Thr Arg Ser Arg Lys Gly Lys Leu Thr
            270                 275                 280
atg gat gac tac cag ggc gtt acc gtt tcc ttg acc aac cca ggt ggc     1336
Met Asp Asp Tyr Gln Gly Val Thr Val Ser Leu Thr Asn Pro Gly Gly
        285                 290                 295
atc ggt acc cgc cac tct gtc cca cgt ctg acc aag ggc cag ggc acc     1384
Ile Gly Thr Arg His Ser Val Pro Arg Leu Thr Lys Gly Gln Gly Thr
```

```
    300                 305                 310
atc atc ggt gtc ggt tcc atg gat tac cca gca gag ttc cag ggc gct  1432
Ile Ile Gly Val Gly Ser Met Asp Tyr Pro Ala Glu Phe Gln Gly Ala
315                 320                 325                 330
tcc gaa gac cgc ctt gca gag ctc ggc gtt gga aag ctt gtc acc atc  1480
Ser Glu Asp Arg Leu Ala Glu Leu Gly Val Gly Lys Leu Val Thr Ile
                335                 340                 345
acc tcc acc tac gat cac cgc gtg atc cag ggt gct gtg tcc ggt gaa  1528
Thr Ser Thr Tyr Asp His Arg Val Ile Gln Gly Ala Val Ser Gly Glu
            350                 355                 360
ttc ctg cgt acc atg tct cgc ctg ctc acc gat gat tcc ttc tgg gat  1576
Phe Leu Arg Thr Met Ser Arg Leu Leu Thr Asp Asp Ser Phe Trp Asp
        365                 370                 375
gag atc ttc gac gca atg aac gtt cct tac acc cca atg cgt tgg gca  1624
Glu Ile Phe Asp Ala Met Asn Val Pro Tyr Thr Pro Met Arg Trp Ala
    380                 385                 390
cag gac gtt cca aac acc ggt gtt gat aag aac acc cgc gtc atg cag  1672
Gln Asp Val Pro Asn Thr Gly Val Asp Lys Asn Thr Arg Val Met Gln
395                 400                 405                 410
ctc att gag gca tac cgc tcc cgt gga cac ctc atc gct gac acc aac  1720
Leu Ile Glu Ala Tyr Arg Ser Arg Gly His Leu Ile Ala Asp Thr Asn
                415                 420                 425
cca ctt tca tgg gtt cag cct ggc atg cca gtt cca gac cac cgc gac  1768
Pro Leu Ser Trp Val Gln Pro Gly Met Pro Val Pro Asp His Arg Asp
            430                 435                 440
ctc gac atc gag acc cac agc ctg acc atc tgg gat ctg gac cgt acc  1816
Leu Asp Ile Glu Thr His Ser Leu Thr Ile Trp Asp Leu Asp Arg Thr
        445                 450                 455
ttc agc gtc ggt ggc ttc ggc ggc aag gag acc atg acc ctg cgc gag  1864
Phe Ser Val Gly Gly Phe Gly Gly Lys Glu Thr Met Thr Leu Arg Glu
    460                 465                 470
gta ctg tcc cgc ctg cgc gct gcc tac acc ttg aag gtc ggc tcc gaa  1912
Val Leu Ser Arg Leu Arg Ala Ala Tyr Thr Leu Lys Val Gly Ser Glu
475                 480                 485                 490
tac acc cac atc ctg gac cgc gac gag cgc acc tgg ctg cag gac cgc  1960
Tyr Thr His Ile Leu Asp Arg Asp Glu Arg Thr Trp Leu Gln Asp Arg
                495                 500                 505
ctc gaa gcc gga atg cca aag cca acc cag gca gag cag aag tac atc  2008
Leu Glu Ala Gly Met Pro Lys Pro Thr Gln Ala Glu Gln Lys Tyr Ile
            510                 515                 520
ctg cag aag ctg aac gcc gca gag gct ttc gag aac ttc ctg cag acc  2056
Leu Gln Lys Leu Asn Ala Ala Glu Ala Phe Glu Asn Phe Leu Gln Thr
        525                 530                 535
aag tac gtc ggc cag aag cgc ttc tcc ctc gaa ggt gca gaa gct ctc  2104
Lys Tyr Val Gly Gln Lys Arg Phe Ser Leu Glu Gly Ala Glu Ala Leu
    540                 545                 550
atc cca ctg atg gac tcc gcc atc gac acc gcc gca ggc cag ggc ctc  2152
```

```
Ile Pro Leu Met Asp Ser Ala Ile Asp Thr Ala Ala Gly Gln Gly Leu
555                 560                 565                 570
gac gaa gtt gtc atc ggt atg cca cac cgt ggt cgc ctc aac gtg ctg      2200
Asp Glu Val Val Ile Gly Met Pro His Arg Gly Arg Leu Asn Val Leu
                575                 580                 585
ttc aac atc gtg ggc aag cca ctg gca tcc atc ttc aac gag ttt gaa      2248
Phe Asn Ile Val Gly Lys Pro Leu Ala Ser Ile Phe Asn Glu Phe Glu
            590                 595                 600
ggc caa atg gag cag ggc cag atc ggt ggc tcc ggt gac gtg aag tac      2296
Gly Gln Met Glu Gln Gly Gln Ile Gly Gly Ser Gly Asp Val Lys Tyr
        605                 610                 615
cac ctc ggt tcc gaa ggc cag cac ctg cag atg ttc ggc gac ggc gag      2344
His Leu Gly Ser Glu Gly Gln His Leu Gln Met Phe Gly Asp Gly Glu
    620                 625                 630
atc aag gtc tcc ctg act gct aac ccg tcc cac ctg gaa gct gtt aac      2392
Ile Lys Val Ser Leu Thr Ala Asn Pro Ser His Leu Glu Ala Val Asn
635                 640                 645                 650
cca gtg atg gaa ggt atc gtc cgc gca aag cag gac tac ctg gac aag      2440
Pro Val Met Glu Gly Ile Val Arg Ala Lys Gln Asp Tyr Leu Asp Lys
                655                 660                 665
ggc gta gac ggc aag act gtt gtg cca ctg ctg ctc cac ggt gac gct      2488
Gly Val Asp Gly Lys Thr Val Val Pro Leu Leu Leu His Gly Asp Ala
            670                 675                 680
gca ttc gca ggc ctg ggc atc gtg cca gaa acc atc aac ctg gct aag      2536
Ala Phe Ala Gly Leu Gly Ile Val Pro Glu Thr Ile Asn Leu Ala Lys
        685                 690                 695
ctg cgt ggc tac gac gtc gga ggc acc atc cac atc gtg gtg aac aac      2584
Leu Arg Gly Tyr Asp Val Gly Gly Thr Ile His Ile Val Val Asn Asn
    700                 705                 710
cag atc ggc ttc acc acc acc cca gac tcc agc cgc tcc atg cac tac      2632
Gln Ile Gly Phe Thr Thr Thr Pro Asp Ser Ser Arg Ser Met His Tyr
715                 720                 725                 730
gca acc gac tac gcc aag gca ttc ggc tgc cca gtc ttc cac gtc aat      2680
Ala Thr Asp Tyr Ala Lys Ala Phe Gly Cys Pro Val Phe His Val Asn
                735                 740                 745
ggt gat gac cca gag gca gtt gtc tgg gtt ggc cag ctg gca acc gag      2728
Gly Asp Asp Pro Glu Ala Val Val Trp Val Gly Gln Leu Ala Thr Glu
            750                 755                 760
tac cgt cgt cgc ttc ggc aag gac gtc ttc atc gac ctc gtt tgc tac      2776
Tyr Arg Arg Arg Phe Gly Lys Asp Val Phe Ile Asp Leu Val Cys Tyr
        765                 770                 775
cgc ctc cgc ggc cac aac gaa gct gat gat cct tcc atg acc cag cca      2824
Arg Leu Arg Gly His Asn Glu Ala Asp Asp Pro Ser Met Thr Gln Pro
    780                 785                 790
aag atg tat gag ctc atc acc ggc cgc gag acc gtt cgt gct cag tac      2872
Lys Met Tyr Glu Leu Ile Thr Gly Arg Glu Thr Val Arg Ala Gln Tyr
795                 800                 805                 810
```

```
acc gaa gac ctg ctc gga cgt gga gac ctc tcc aac gaa gat gca gaa      2920
Thr Glu Asp Leu Leu Gly Arg Gly Asp Leu Ser Asn Glu Asp Ala Glu
                815                 820                 825
gca gtc gtc cgc gac ttc cac gac cag atg gaa tct gtg ttc aac gaa      2968
Ala Val Val Arg Asp Phe His Asp Gln Met Glu Ser Val Phe Asn Glu
            830                 835                 840
gtc aag gaa ggc ggc aag aag cag gct gag gca cag acc ggc atc acc      3016
Val Lys Glu Gly Gly Lys Lys Gln Ala Glu Ala Gln Thr Gly Ile Thr
        845                 850                 855
ggc tcc cag aag ctt cca cac ggc ctt gag acc aac atc tcc cgt gaa      3064
Gly Ser Gln Lys Leu Pro His Gly Leu Glu Thr Asn Ile Ser Arg Glu
    860                 865                 870
gag ctc ctg gaa ctg gga cag gct ttc gcc aac acc cca gaa ggc ttc      3112
Glu Leu Leu Glu Leu Gly Gln Ala Phe Ala Asn Thr Pro Glu Gly Phe
875                 880                 885                 890
aac tac cac cca cgt gtg gct cca gtt gct aag aag cgc gtc tcc tct      3160
Asn Tyr His Pro Arg Val Ala Pro Val Ala Lys Lys Arg Val Ser Ser
                895                 900                 905
gtc acc gaa ggt ggc atc gac tgg gca tgg ggc gag ctc ctc gcc ttc      3208
Val Thr Glu Gly Gly Ile Asp Trp Ala Trp Gly Glu Leu Leu Ala Phe
            910                 915                 920
ggt tcc ctg gct aac tcc ggc cgc ttg gtt cgc ctt gca ggt gaa gat      3256
Gly Ser Leu Ala Asn Ser Gly Arg Leu Val Arg Leu Ala Gly Glu Asp
        925                 930                 935
tcc cgc cgc ggt acc ttc acc cag cgc cac gca gtt gcc atc gac cca      3304
Ser Arg Arg Gly Thr Phe Thr Gln Arg His Ala Val Ala Ile Asp Pro
    940                 945                 950
gcg acc gct gaa gag ttc aac cca ctc cac gag ctt gca cag tcc aag      3352
Ala Thr Ala Glu Glu Phe Asn Pro Leu His Glu Leu Ala Gln Ser Lys
955                 960                 965                 970
ggc aac aac ggt aag ttc ctg gtc tac aac tcc gca ctg acc gag tac      3400
Gly Asn Asn Gly Lys Phe Leu Val Tyr Asn Ser Ala Leu Thr Glu Tyr
                975                 980                 985
gca ggc atg ggc ttc gag tac ggc tac tcc gta gga aac gaa  gac tcc      3448
Ala Gly Met Gly Phe Glu Tyr Gly Tyr Ser Val Gly Asn Glu  Asp Ser
            990                 995                1000
gtc gtt gca  tgg gaa gca cag ttc  ggc gac ttc gcc aac  ggc gct      3493
Val Val Ala  Trp Glu Ala Gln Phe  Gly Asp Phe Ala Asn  Gly Ala
        1005                1010                1015
cag acc atc  atc gat gag tac gtc  tcc tca ggc gaa gct  aag tgg      3538
Gln Thr Ile  Ile Asp Glu Tyr Val  Ser Ser Gly Glu Ala  Lys Trp
        1020                1025                1030
ggc cag acc  tcc aag ctg atc ctt  ctg ctg cct cac ggc  tac gaa      3583
Gly Gln Thr  Ser Lys Leu Ile Leu  Leu Leu Pro His Gly  Tyr Glu
        1035                1040                1045
ggc cag ggc  cca gac cac tct tcc  gca cgt atc gag cgc  ttc ctg      3628
Gly Gln Gly  Pro Asp His Ser Ser  Ala Arg Ile Glu Arg  Phe Leu
```

```
        1050                1055                1060
cag ctg tgc gct gag ggt tcc atg act gtt gct cag cca tcc acc      3673
Gln Leu Cys Ala Glu Gly Ser Met Thr Val Ala Gln Pro Ser Thr
        1065                1070                1075
cca gca aac cac ttc cac ctg ctg cgt cgt cac gct ctg tcc gac      3718
Pro Ala Asn His Phe His Leu Leu Arg Arg His Ala Leu Ser Asp
        1080                1085                1090
ctg aag cgt cca ctg gtt atc ttc acc ccg aag tcc atg ctg cgt      3763
Leu Lys Arg Pro Leu Val Ile Phe Thr Pro Lys Ser Met Leu Arg
        1095                1100                1105
aac aag gct gct gcc tcc gca cca gaa gac ttc act gag gtc acc      3808
Asn Lys Ala Ala Ala Ser Ala Pro Glu Asp Phe Thr Glu Val Thr
        1110                1115                1120
aag ttc caa tcc gtg atc gac gat cca aac gtt gca gat gca gcc      3853
Lys Phe Gln Ser Val Ile Asp Asp Pro Asn Val Ala Asp Ala Ala
        1125                1130                1135
aag gtg aag aag gtc atg ctg gtc tcc ggc aag ctg tac tac gaa      3898
Lys Val Lys Lys Val Met Leu Val Ser Gly Lys Leu Tyr Tyr Glu
        1140                1145                1150
ttg gca aag cgc aag gag aag gac gga cgc gac gac atc gcg atc      3943
Leu Ala Lys Arg Lys Glu Lys Asp Gly Arg Asp Asp Ile Ala Ile
        1155                1160                1165
gtt cgt atc gaa atg ctc cac cca att ccg ttc aac cgc atc tcc      3988
Val Arg Ile Glu Met Leu His Pro Ile Pro Phe Asn Arg Ile Ser
        1170                1175                1180
gag gct ctt gcc ggc tac cct aac gct gag gaa gtc ctc ttc gtt      4033
Glu Ala Leu Ala Gly Tyr Pro Asn Ala Glu Glu Val Leu Phe Val
        1185                1190                1195
cag gat gag cca gca aac cag ggc cca tgg ccg ttc tac cag gag      4078
Gln Asp Glu Pro Ala Asn Gln Gly Pro Trp Pro Phe Tyr Gln Glu
        1200                1205                1210
cac ctc cca gag ctg atc ccg aac atg cca aag atg cgc cgc gtt      4123
His Leu Pro Glu Leu Ile Pro Asn Met Pro Lys Met Arg Arg Val
        1215                1220                1225
tcc cgc cgc gct cag tcc tcc acc gca act ggt gtt gct aag gtg      4168
Ser Arg Arg Ala Gln Ser Ser Thr Ala Thr Gly Val Ala Lys Val
        1230                1235                1240
cac cag ctg gag gag aag cag ctt atc gac gag gct ttc gag gct      4213
His Gln Leu Glu Glu Lys Gln Leu Ile Asp Glu Ala Phe Glu Ala
        1245                1250                1255
taagtcttta tagtcctgca ctagcctaga gggccttatg cagtgtgaat cacacagcat   4273
aaggcccttt ttgctgccgt ggttgcctaa ggtggaaggc atgaaacgaa tctgtgcggt   4333
cacgatctct tcagtacttt tgctaagtgg ctgctcctcc acttccacca cgcagctcga   4393
g                                                                   4394
```

<210> 10

<211> 1257
<212> PRT
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 10

```
Met Leu Gln Leu Gly Leu Arg His Asn Gln Pro Thr Thr Asn Val Thr
1               5                  10                  15
Val Asp Lys Ile Lys Leu Asn Lys Pro Ser Arg Ser Lys Glu Lys Arg
            20                  25                  30
Arg Val Pro Ala Val Ser Ser Ala Ser Thr Phe Gly Gln Asn Ala Trp
        35                  40                  45
Leu Val Asp Glu Met Phe Gln Gln Phe Gln Lys Asp Pro Lys Ser Val
    50                  55                  60
Asp Lys Glu Trp Arg Glu Leu Phe Glu Ala Gln Gly Gly Pro Asn Ala
65                  70                  75                  80
Thr Pro Ala Thr Thr Glu Ala Gln Pro Ser Ala Pro Lys Glu Ser Ala
                85                  90                  95
Lys Pro Ala Pro Lys Ala Ala Pro Ala Ala Lys Ala Ala Pro Arg Val
            100                 105                 110
Glu Thr Lys Pro Ala Ala Lys Thr Ala Pro Lys Ala Lys Glu Ser Ser
        115                 120                 125
Val Pro Gln Gln Pro Lys Leu Pro Glu Pro Gly Gln Thr Pro Ile Arg
    130                 135                 140
Gly Ile Phe Lys Ser Ile Ala Lys Asn Met Asp Ile Ser Leu Glu Ile
145                 150                 155                 160
Pro Thr Ala Thr Ser Val Arg Asp Met Pro Ala Arg Leu Met Phe Glu
                165                 170                 175
Asn Arg Ala Met Val Asn Asp Gln Leu Lys Arg Thr Arg Gly Gly Lys
            180                 185                 190
Ile Ser Phe Thr His Ile Ile Gly Tyr Ala Met Val Lys Ala Val Met
        195                 200                 205
Ala His Pro Asp Met Asn Asn Ser Tyr Asp Val Ile Asp Gly Lys Pro
    210                 215                 220
Thr Leu Ile Val Pro Glu His Ile Asn Leu Gly Leu Ala Ile Asp Leu
225                 230                 235                 240
Pro Gln Lys Asp Gly Ser Arg Ala Leu Val Val Ala Ala Ile Lys Glu
                245                 250                 255
Thr Glu Lys Met Asn Phe Ser Glu Phe Leu Ala Ala Tyr Glu Asp Ile
            260                 265                 270
Val Thr Arg Ser Arg Lys Gly Lys Leu Thr Met Asp Asp Tyr Gln Gly
        275                 280                 285
Val Thr Val Ser Leu Thr Asn Pro Gly Gly Ile Gly Thr Arg His Ser
    290                 295                 300
Val Pro Arg Leu Thr Lys Gly Gln Gly Thr Ile Ile Gly Val Gly Ser
305                 310                 315                 320
Met Asp Tyr Pro Ala Glu Phe Gln Gly Ala Ser Glu Asp Arg Leu Ala
                325                 330                 335
```

Glu Leu Gly Val Gly Lys Leu Val Thr Ile Thr Ser Thr Tyr Asp His
340 345 350
Arg Val Ile Gln Gly Ala Val Ser Gly Glu Phe Leu Arg Thr Met Ser
355 360 365
Arg Leu Leu Thr Asp Asp Ser Phe Trp Asp Glu Ile Phe Asp Ala Met
370 375 380
Asn Val Pro Tyr Thr Pro Met Arg Trp Ala Gln Asp Val Pro Asn Thr
385 390 395 400
Gly Val Asp Lys Asn Thr Arg Val Met Gln Leu Ile Glu Ala Tyr Arg
405 410 415
Ser Arg Gly His Leu Ile Ala Asp Thr Asn Pro Leu Ser Trp Val Gln
420 425 430
Pro Gly Met Pro Val Pro Asp His Arg Asp Leu Asp Ile Glu Thr His
435 440 445
Ser Leu Thr Ile Trp Asp Leu Asp Arg Thr Phe Ser Val Gly Gly Phe
450 455 460
Gly Gly Lys Glu Thr Met Thr Leu Arg Glu Val Leu Ser Arg Leu Arg
465 470 475 480
Ala Ala Tyr Thr Leu Lys Val Gly Ser Glu Tyr Thr His Ile Leu Asp
485 490 495
Arg Asp Glu Arg Thr Trp Leu Gln Asp Arg Leu Glu Ala Gly Met Pro
500 505 510
Lys Pro Thr Gln Ala Glu Gln Lys Tyr Ile Leu Gln Lys Leu Asn Ala
515 520 525
Ala Glu Ala Phe Glu Asn Phe Leu Gln Thr Lys Tyr Val Gly Gln Lys
530 535 540
Arg Phe Ser Leu Glu Gly Ala Glu Ala Leu Ile Pro Leu Met Asp Ser
545 550 555 560
Ala Ile Asp Thr Ala Ala Gly Gln Gly Leu Asp Glu Val Val Ile Gly
565 570 575
Met Pro His Arg Gly Arg Leu Asn Val Leu Phe Asn Ile Val Gly Lys
580 585 590
Pro Leu Ala Ser Ile Phe Asn Glu Phe Glu Gly Gln Met Glu Gln Gly
595 600 605
Gln Ile Gly Gly Ser Gly Asp Val Lys Tyr His Leu Gly Ser Glu Gly
610 615 620
Gln His Leu Gln Met Phe Gly Asp Gly Glu Ile Lys Val Ser Leu Thr
625 630 635 640
Ala Asn Pro Ser His Leu Glu Ala Val Asn Pro Val Met Glu Gly Ile
645 650 655
Val Arg Ala Lys Gln Asp Tyr Leu Asp Lys Gly Val Asp Gly Lys Thr
660 665 670
Val Val Pro Leu Leu Leu His Gly Asp Ala Ala Phe Ala Gly Leu Gly
675 680 685
Ile Val Pro Glu Thr Ile Asn Leu Ala Lys Leu Arg Gly Tyr Asp Val
690 695 700
Gly Gly Thr Ile His Ile Val Val Asn Asn Gln Ile Gly Phe Thr Thr

705 710 715 720
Thr Pro Asp Ser Ser Arg Ser Met His Tyr Ala Thr Asp Tyr Ala Lys
725 730 735
Ala Phe Gly Cys Pro Val Phe His Val Asn Gly Asp Asp Pro Glu Ala
740 745 750
Val Val Trp Val Gly Gln Leu Ala Thr Glu Tyr Arg Arg Arg Phe Gly
755 760 765
Lys Asp Val Phe Ile Asp Leu Val Cys Tyr Arg Leu Arg Gly His Asn
770 775 780
Glu Ala Asp Asp Pro Ser Met Thr Gln Pro Lys Met Tyr Glu Leu Ile
785 790 795 800
Thr Gly Arg Glu Thr Val Arg Ala Gln Tyr Thr Glu Asp Leu Leu Gly
805 810 815
Arg Gly Asp Leu Ser Asn Glu Asp Ala Glu Ala Val Val Arg Asp Phe
820 825 830
His Asp Gln Met Glu Ser Val Phe Asn Glu Val Lys Glu Gly Gly Lys
835 840 845
Lys Gln Ala Glu Ala Gln Thr Gly Ile Thr Gly Ser Gln Lys Leu Pro
850 855 860
His Gly Leu Glu Thr Asn Ile Ser Arg Glu Glu Leu Leu Glu Leu Gly
865 870 875 880
Gln Ala Phe Ala Asn Thr Pro Glu Gly Phe Asn Tyr His Pro Arg Val
885 890 895
Ala Pro Val Ala Lys Lys Arg Val Ser Ser Val Thr Glu Gly Gly Ile
900 905 910
Asp Trp Ala Trp Gly Glu Leu Leu Ala Phe Gly Ser Leu Ala Asn Ser
915 920 925
Gly Arg Leu Val Arg Leu Ala Gly Glu Asp Ser Arg Arg Gly Thr Phe
930 935 940
Thr Gln Arg His Ala Val Ala Ile Asp Pro Ala Thr Ala Glu Glu Phe
945 950 955 960
Asn Pro Leu His Glu Leu Ala Gln Ser Lys Gly Asn Asn Gly Lys Phe
965 970 975
Leu Val Tyr Asn Ser Ala Leu Thr Glu Tyr Ala Gly Met Gly Phe Glu
980 985 990
Tyr Gly Tyr Ser Val Gly Asn Glu Asp Ser Val Val Ala Trp Glu Ala
995 1000 1005
Gln Phe Gly Asp Phe Ala Asn Gly Ala Gln Thr Ile Ile Asp Glu
1010 1015 1020
Tyr Val Ser Ser Gly Glu Ala Lys Trp Gly Gln Thr Ser Lys Leu
1025 1030 1035
Ile Leu Leu Leu Pro His Gly Tyr Glu Gly Gln Gly Pro Asp His
1040 1045 1050
Ser Ser Ala Arg Ile Glu Arg Phe Leu Gln Leu Cys Ala Glu Gly
1055 1060 1065
Ser Met Thr Val Ala Gln Pro Ser Thr Pro Ala Asn His Phe His
1070 1075 1080

```
Leu Leu  Arg Arg His Ala Leu  Ser Asp Leu Lys Arg  Pro Leu Val
    1085                 1090                 1095
Ile Phe  Thr Pro Lys Ser Met  Leu Arg Asn Lys Ala  Ala Ala Ser
    1100                 1105                 1110
Ala Pro  Glu Asp Phe Thr Glu  Val Thr Lys Phe Gln  Ser Val Ile
    1115                 1120                 1125
Asp Asp  Pro Asn Val Ala Asp  Ala Ala Lys Val Lys  Lys Val Met
    1130                 1135                 1140
Leu Val  Ser Gly Lys Leu Tyr  Tyr Glu Leu Ala Lys  Arg Lys Glu
    1145                 1150                 1155
Lys Asp  Gly Arg Asp Asp Ile  Ala Ile Val Arg Ile  Glu Met Leu
    1160                 1165                 1170
His Pro  Ile Pro Phe Asn Arg  Ile Ser Glu Ala Leu  Ala Gly Tyr
    1175                 1180                 1185
Pro Asn  Ala Glu Glu Val Leu  Phe Val Gln Asp Glu  Pro Ala Asn
    1190                 1195                 1200
Gln Gly  Pro Trp Pro Phe Tyr  Gln Glu His Leu Pro  Glu Leu Ile
    1205                 1210                 1215
Pro Asn  Met Pro Lys Met Arg  Arg Val Ser Arg Arg  Ala Gln Ser
    1220                 1225                 1230
Ser Thr  Ala Thr Gly Val Ala  Lys Val His Gln Leu  Glu Glu Lys
    1235                 1240                 1245
Gln Leu  Ile Asp Glu Ala Phe  Glu Ala
    1250                 1255
```

<210> 11
<211> 1471
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<221> CDS
<222> (562)..(1182)

<400> 11

```
gtcgataagc tcttgctttt tcgcaggccc cgcaaggtaa cgtccggcta ccgcgcgctg     60
gtacacgcga cgcacgttcg tatcgaccac cggcacgcgc tgcccaaaat gaaacgccgc    120
gaccgcgcgc gccgtgtaat caccgatccc cggcaacgcg agcagcgcct ccaccgtatc    180
cggcacctcg ccggcatgct tttcgacgat cacctccgca cattccttca acctcagcgc    240
cctacgtgga tagcccaact tgccccacga ccgcaaaatc tcatcggtgc tcgcattcgc    300
gaaatcttcc ggagtgggcc atttttccat ccactcacgc caaatcggct cgactcgcgc    360
gacgggagtt tgttggctca tcacctctga aaggagaatt ccccatgctg aagtattggg    420
atcacgccac gcaagatcgc gggcatttgc tctaaaccac acgagcaggg ctgtttgaaa    480
agctgtaaat gacatgacct aaatgattgt actgactggc acattaggtc atacgtcaca    540
ccgagtggaa gaatagagct t atg cct ttg cgt aat gtt gat aga act ccg      591
```

```
                                Met Pro Leu Arg Asn Val Asp Arg Thr Pro
                                1               5                   10
ccc gca gta tgg gaa gca ctg ctt gcc gga aac gaa aga ttc atc agt      639
Pro Ala Val Trp Glu Ala Leu Leu Ala Gly Asn Glu Arg Phe Ile Ser
                15                  20                  25
ttc aac gaa gat cga cca aac cag gac gcc ccg cgc aga aaa gaa ctt      687
Phe Asn Glu Asp Arg Pro Asn Gln Asp Ala Pro Arg Arg Lys Glu Leu
            30                  35                  40
cgc aat ggg caa acg cct gca gct gtt gtc att tcc tgt tca gat tct      735
Arg Asn Gly Gln Thr Pro Ala Ala Val Val Ile Ser Cys Ser Asp Ser
        45                  50                  55
cga gtg cca gtt gaa ttt att ttt gac gtc ggt ctc ggt gac ctc ttt      783
Arg Val Pro Val Glu Phe Ile Phe Asp Val Gly Leu Gly Asp Leu Phe
    60                  65                  70
gtt gtc cgt act gcc gga gaa atc ctc gac caa gca gtg ctt gca tcc      831
Val Val Arg Thr Ala Gly Glu Ile Leu Asp Gln Ala Val Leu Ala Ser
75                  80                  85                  90
atc gaa tac gcc act gaa tcc atc ggc gtt cca ttg gtt atc gtc atg      879
Ile Glu Tyr Ala Thr Glu Ser Ile Gly Val Pro Leu Val Ile Val Met
                95                  100                 105
ggc cac gaa tcc tgt ggt gca gtt gca gca act gca gca gca ctt gaa      927
Gly His Glu Ser Cys Gly Ala Val Ala Ala Thr Ala Ala Ala Leu Glu
            110                 115                 120
ggc ggt gca ctt ccc gga ggc tac caa cga gtt ttg gta gaa aag gtt      975
Gly Gly Ala Leu Pro Gly Gly Tyr Gln Arg Val Leu Val Glu Lys Val
        125                 130                 135
gca cca tcc att cta gaa gcc aag gca gag ggc ctg agc tcc atc aag     1023
Ala Pro Ser Ile Leu Glu Ala Lys Ala Glu Gly Leu Ser Ser Ile Lys
    140                 145                 150
gaa ttc gag gaa cac cac gtt gtg gca acg gta aac caa ctg ttg tcc     1071
Glu Phe Glu Glu His His Val Val Ala Thr Val Asn Gln Leu Leu Ser
155                 160                 165                 170
cgt tct cca gag att cat cag aag gtc gaa acc ggc gag ttg gga atc     1119
Arg Ser Pro Glu Ile His Gln Lys Val Glu Thr Gly Glu Leu Gly Ile
                175                 180                 185
att ggt ttg cgc tac cga ctc tct gac ggt cgt act gaa cct gta att     1167
Ile Gly Leu Arg Tyr Arg Leu Ser Asp Gly Arg Thr Glu Pro Val Ile
            190                 195                 200
agc aag aac gtg ggt tagttttcgg tctgagattg cctatgatcg gtgatttggg     1222
Ser Lys Asn Val Gly
        205
ggccgtgggc agtgtggttt ggtagttcgg gggactcaag ttagagaaac cagacaggcg   1282
tgccaagact ctgggttttt ccaggttttg gaacgcctgt ccggtttaga ggtttagaga   1342
ttgagaaccg gttgggaacc ggacacaggt gccagaagtt cggcttttta ggtaatcttg   1402
gcacgccagt ttgatcgctg tggaaactat cacaattccc gtcctgaaca gcgaaaaagt   1462
gacctcgca                                                          1471
```

<210> 12
<211> 207
<212> PRT
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 12

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

<210> 13
<211> 624
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(621)

<400> 13

```
atg cct ttg cgt aat gtt gat aga act ccg ccc gca gta tgg gaa gca      48
```

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

<210> 14
<211> 207
<212> PRT
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 14

```
Met Pro Leu Arg Asn Val Asp Arg Thr Pro Pro Ala Val Trp Glu Ala
```

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

<210> 15
<211> 2367
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2364)

<400> 15

```
atg tct aca gat tac tca tca cca gca tat ttg caa aaa gtt gat aag      48
Met Ser Thr Asp Tyr Ser Ser Pro Ala Tyr Leu Gln Lys Val Asp Lys
1               5                   10                  15
tac tgg cgt gct gcc aac tat tta tca gtt ggt caa ctt tat tta aaa      96
Tyr Trp Arg Ala Ala Asn Tyr Leu Ser Val Gly Gln Leu Tyr Leu Lys
            20                  25                  30
gat aat cct tta tta caa cgg cca tta aag gct agt gac gtt aag gtt     144
Asp Asn Pro Leu Leu Gln Arg Pro Leu Lys Ala Ser Asp Val Lys Val
        35                  40                  45
```

```
cac cca atc ggt cac tgg ggc acg att gcc ggc caa aac ttc atc tat      192
His Pro Ile Gly His Trp Gly Thr Ile Ala Gly Gln Asn Phe Ile Tyr
    50                  55                  60
gcg cat ctt aac cgg gtc atc aac aag tac ggt ttg aag atg ttc tac      240
Ala His Leu Asn Arg Val Ile Asn Lys Tyr Gly Leu Lys Met Phe Tyr
65                  70                  75                  80
gtt gaa ggt cca ggt cat ggt ggc caa gtg atg gtc tcc aac tca tac      288
Val Glu Gly Pro Gly His Gly Gly Gln Val Met Val Ser Asn Ser Tyr
                85                  90                  95
ctt gat ggg act tac acg gat att tat cct gaa att acg cag gat gtt      336
Leu Asp Gly Thr Tyr Thr Asp Ile Tyr Pro Glu Ile Thr Gln Asp Val
            100                 105                 110
gaa ggg atg caa aaa ctc ttc aag caa ttc tca ttc cca ggt ggc gtg      384
Glu Gly Met Gln Lys Leu Phe Lys Gln Phe Ser Phe Pro Gly Gly Val
        115                 120                 125
gct tcc cat gct gct cct gaa aca cca ggc tca atc cac gaa ggt ggc      432
Ala Ser His Ala Ala Pro Glu Thr Pro Gly Ser Ile His Glu Gly Gly
    130                 135                 140
gaa ctt ggt tac tca att tca cac ggt gtt ggg gca atc ctt gac aac      480
Glu Leu Gly Tyr Ser Ile Ser His Gly Val Gly Ala Ile Leu Asp Asn
145                 150                 155                 160
cct gat gaa atc gcc gca gtc gtt gtt ggt gat ggg gaa tcc gaa acc      528
Pro Asp Glu Ile Ala Ala Val Val Val Gly Asp Gly Glu Ser Glu Thr
                165                 170                 175
ggc cca tta gca act tca tgg caa tca acg aag ttc atc aac cca atc      576
Gly Pro Leu Ala Thr Ser Trp Gln Ser Thr Lys Phe Ile Asn Pro Ile
            180                 185                 190
aac gat ggg gca gtg tta cca atc ttg aac ctt aac ggc ttt aag att      624
Asn Asp Gly Ala Val Leu Pro Ile Leu Asn Leu Asn Gly Phe Lys Ile
        195                 200                 205
tct aac cca acg att ttt ggt cgg act tct gat gaa aag atc aag caa      672
Ser Asn Pro Thr Ile Phe Gly Arg Thr Ser Asp Glu Lys Ile Lys Gln
    210                 215                 220
tac ttc gaa agc atg aac tgg gaa cca atc ttt gtt gaa ggt gac gat      720
Tyr Phe Glu Ser Met Asn Trp Glu Pro Ile Phe Val Glu Gly Asp Asp
225                 230                 235                 240
cct gaa aag gtt cac cca gct tta gct aag gcc atg gat gaa gcc gtc      768
Pro Glu Lys Val His Pro Ala Leu Ala Lys Ala Met Asp Glu Ala Val
                245                 250                 255
gaa aag atc aaa gcc att caa aag aac gct cgt gaa aac gat gac gct      816
Glu Lys Ile Lys Ala Ile Gln Lys Asn Ala Arg Glu Asn Asp Asp Ala
            260                 265                 270
act tta cca gta tgg ccg atg atc gtc ttc cgc gca cct aag ggc tgg      864
Thr Leu Pro Val Trp Pro Met Ile Val Phe Arg Ala Pro Lys Gly Trp
        275                 280                 285
act ggt cct aag tca tgg gat ggc gac aag atc gaa ggt tca ttc cga      912
Thr Gly Pro Lys Ser Trp Asp Gly Asp Lys Ile Glu Gly Ser Phe Arg
```

```
    290                 295                 300
gct cac caa att cca att cct gtt gac caa acc gac atg gaa cat gcc      960
Ala His Gln Ile Pro Ile Pro Val Asp Gln Thr Asp Met Glu His Ala
305                 310                 315                 320
gat gcg tta gtt gac tgg ttg gaa tca tat caa cca aag gaa ctc ttc     1008
Asp Ala Leu Val Asp Trp Leu Glu Ser Tyr Gln Pro Lys Glu Leu Phe
                325                 330                 335
aat gaa gat ggt tct ttg aag gat gat atc aaa gaa att atc cca act     1056
Asn Glu Asp Gly Ser Leu Lys Asp Asp Ile Lys Glu Ile Ile Pro Thr
            340                 345                 350
ggc gat gca cgg atg gcc gct aac cca atc act aat ggt ggg gtt gat     1104
Gly Asp Ala Arg Met Ala Ala Asn Pro Ile Thr Asn Gly Gly Val Asp
        355                 360                 365
cca aag gcc ttg aac tta cct aac ttc cgt gat tac gcc gtt gat acg     1152
Pro Lys Ala Leu Asn Leu Pro Asn Phe Arg Asp Tyr Ala Val Asp Thr
    370                 375                 380
tct aag cat ggt gcc aac gtt aag caa gat atg atc gtt tgg tca gac     1200
Ser Lys His Gly Ala Asn Val Lys Gln Asp Met Ile Val Trp Ser Asp
385                 390                 395                 400
tac ttg cgt gat gtt atc aag aag aac cca gat aac ttc cgg tta ttt     1248
Tyr Leu Arg Asp Val Ile Lys Lys Asn Pro Asp Asn Phe Arg Leu Phe
                405                 410                 415
ggc cct gat gaa acc atg tca aac cgg tta tat ggt gtc ttt gaa acc     1296
Gly Pro Asp Glu Thr Met Ser Asn Arg Leu Tyr Gly Val Phe Glu Thr
            420                 425                 430
act aac cgt caa tgg atg gaa gat att cac cca gat agt gac caa tac     1344
Thr Asn Arg Gln Trp Met Glu Asp Ile His Pro Asp Ser Asp Gln Tyr
        435                 440                 445
gaa gca cct gct ggc cgg gtc ttg gat gct caa tta tct gaa cac caa     1392
Glu Ala Pro Ala Gly Arg Val Leu Asp Ala Gln Leu Ser Glu His Gln
    450                 455                 460
gct gaa ggt tgg tta gaa ggt tac gtc tta act ggt cgt cat ggc ttg     1440
Ala Glu Gly Trp Leu Glu Gly Tyr Val Leu Thr Gly Arg His Gly Leu
465                 470                 475                 480
ttt gca agt tac gaa gcc ttc tta cgg gtt gtc gac tca atg ttg acg     1488
Phe Ala Ser Tyr Glu Ala Phe Leu Arg Val Val Asp Ser Met Leu Thr
                485                 490                 495
caa cac ttc aag tgg tta cgt aag gcc aac gaa ctt gac tgg cgg aag     1536
Gln His Phe Lys Trp Leu Arg Lys Ala Asn Glu Leu Asp Trp Arg Lys
            500                 505                 510
aag tac ccg tca ctc aac att atc gcg gct tca act gtg ttc caa caa     1584
Lys Tyr Pro Ser Leu Asn Ile Ile Ala Ala Ser Thr Val Phe Gln Gln
        515                 520                 525
gac cat aat ggg tac acc cac caa gat cca ggt gcc ttg act cat ttg     1632
Asp His Asn Gly Tyr Thr His Gln Asp Pro Gly Ala Leu Thr His Leu
    530                 535                 540
gct gaa aag aag cct gaa tat atc cgc gaa tat tta cca gcc gac gcc     1680
```

```
Ala Glu Lys Lys Pro Glu Tyr Ile Arg Glu Tyr Leu Pro Ala Asp Ala
545                 550                 555                 560
aac tcc ttg tta gct gtt ggg gac gtc atc ttc cgt agc caa gaa aag     1728
Asn Ser Leu Leu Ala Val Gly Asp Val Ile Phe Arg Ser Gln Glu Lys
                565                 570                 575
atc aac tac gtg gtt acg tcg aag cac cca cgt caa caa tgg ttc agc     1776
Ile Asn Tyr Val Val Thr Ser Lys His Pro Arg Gln Gln Trp Phe Ser
            580                 585                 590
att gaa gaa gct aag caa tta gtt gac aac ggt ctt ggt atc att gac     1824
Ile Glu Glu Ala Lys Gln Leu Val Asp Asn Gly Leu Gly Ile Ile Asp
        595                 600                 605
tgg gca agc acg gac caa ggt agc gaa cca gat atc gtg ttt gct gct     1872
Trp Ala Ser Thr Asp Gln Gly Ser Glu Pro Asp Ile Val Phe Ala Ala
    610                 615                 620
gcc gga acg gaa cca acg ctt gaa acg ttg gct gca atc caa ttg ctc     1920
Ala Gly Thr Glu Pro Thr Leu Glu Thr Leu Ala Ala Ile Gln Leu Leu
625                 630                 635                 640
cat gat agc ttc cca gac atg aag att cgt ttc gtg aac gtg gtc gac     1968
His Asp Ser Phe Pro Asp Met Lys Ile Arg Phe Val Asn Val Val Asp
                645                 650                 655
atc ttg aag tta cgt agc cct gaa aag gac cct cgt ggc ttg tca gat     2016
Ile Leu Lys Leu Arg Ser Pro Glu Lys Asp Pro Arg Gly Leu Ser Asp
            660                 665                 670
gct gaa ttt gac cat tac ttc act aag gac aaa cca gtt gtc ttc gcc     2064
Ala Glu Phe Asp His Tyr Phe Thr Lys Asp Lys Pro Val Val Phe Ala
        675                 680                 685
ttc cat ggt tac gaa gac ctg gtt cgt gac atc ttc ttt gat cgt cac     2112
Phe His Gly Tyr Glu Asp Leu Val Arg Asp Ile Phe Phe Asp Arg His
    690                 695                 700
aac cac aac tta cac gtg cat ggc tac cgt gaa aat ggt gac att acg     2160
Asn His Asn Leu His Val His Gly Tyr Arg Glu Asn Gly Asp Ile Thr
705                 710                 715                 720
aca cca ttc gat gtc cgg gtc atg aac caa atg gac cgt ttc gac tta     2208
Thr Pro Phe Asp Val Arg Val Met Asn Gln Met Asp Arg Phe Asp Leu
                725                 730                 735
gca aaa tct gca att gcg gcg caa cca gca atg gaa aac acc ggt gca     2256
Ala Lys Ser Ala Ile Ala Ala Gln Pro Ala Met Glu Asn Thr Gly Ala
            740                 745                 750
gcc ttt gtt caa gac atg gat aac atg ctt gca aaa cac aac gca tac     2304
Ala Phe Val Gln Asp Met Asp Asn Met Leu Ala Lys His Asn Ala Tyr
        755                 760                 765
atc cgt gac gcc gga acc gac ttg cca gaa gtt aac gac tgg caa tgg     2352
Ile Arg Asp Ala Gly Thr Asp Leu Pro Glu Val Asn Asp Trp Gln Trp
    770                 775                 780
aaa ggt ttg aaa taa                                                 2367
Lys Gly Leu Lys
785
```

<210> 16
<211> 788
<212> PRT
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 16

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

305 310 315 320
Asp Ala Leu Val Asp Trp Leu Glu Ser Tyr Gln Pro Lys Glu Leu Phe
325 330 335
Asn Glu Asp Gly Ser Leu Lys Asp Asp Ile Lys Glu Ile Ile Pro Thr
340 345 350
Gly Asp Ala Arg Met Ala Ala Asn Pro Ile Thr Asn Gly Gly Val Asp
355 360 365
Pro Lys Ala Leu Asn Leu Pro Asn Phe Arg Asp Tyr Ala Val Asp Thr
370 375 380
Ser Lys His Gly Ala Asn Val Lys Gln Asp Met Ile Val Trp Ser Asp
385 390 395 400
Tyr Leu Arg Asp Val Ile Lys Lys Asn Pro Asp Asn Phe Arg Leu Phe
405 410 415
Gly Pro Asp Glu Thr Met Ser Asn Arg Leu Tyr Gly Val Phe Glu Thr
420 425 430
Thr Asn Arg Gln Trp Met Glu Asp Ile His Pro Asp Ser Asp Gln Tyr
435 440 445
Glu Ala Pro Ala Gly Arg Val Leu Asp Ala Gln Leu Ser Glu His Gln
450 455 460
Ala Glu Gly Trp Leu Glu Gly Tyr Val Leu Thr Gly Arg His Gly Leu
465 470 475 480
Phe Ala Ser Tyr Glu Ala Phe Leu Arg Val Val Asp Ser Met Leu Thr
485 490 495
Gln His Phe Lys Trp Leu Arg Lys Ala Asn Glu Leu Asp Trp Arg Lys
500 505 510
Lys Tyr Pro Ser Leu Asn Ile Ile Ala Ala Ser Thr Val Phe Gln Gln
515 520 525
Asp His Asn Gly Tyr Thr His Gln Asp Pro Gly Ala Leu Thr His Leu
530 535 540
Ala Glu Lys Lys Pro Glu Tyr Ile Arg Glu Tyr Leu Pro Ala Asp Ala
545 550 555 560
Asn Ser Leu Leu Ala Val Gly Asp Val Ile Phe Arg Ser Gln Glu Lys
565 570 575
Ile Asn Tyr Val Val Thr Ser Lys His Pro Arg Gln Gln Trp Phe Ser
580 585 590
Ile Glu Glu Ala Lys Gln Leu Val Asp Asn Gly Leu Gly Ile Ile Asp
595 600 605
Trp Ala Ser Thr Asp Gln Gly Ser Glu Pro Asp Ile Val Phe Ala Ala
610 615 620
Ala Gly Thr Glu Pro Thr Leu Glu Thr Leu Ala Ala Ile Gln Leu Leu
625 630 635 640
His Asp Ser Phe Pro Asp Met Lys Ile Arg Phe Val Asn Val Val Asp
645 650 655
Ile Leu Lys Leu Arg Ser Pro Glu Lys Asp Pro Arg Gly Leu Ser Asp
660 665 670
Ala Glu Phe Asp His Tyr Phe Thr Lys Asp Lys Pro Val Val Phe Ala
675 680 685

```
Phe His Gly Tyr Glu Asp Leu Val Arg Asp Ile Phe Phe Asp Arg His
    690                 695                 700
Asn His Asn Leu His Val His Gly Tyr Arg Glu Asn Gly Asp Ile Thr
705                 710                 715                 720
Thr Pro Phe Asp Val Arg Val Met Asn Gln Met Asp Arg Phe Asp Leu
                725                 730                 735
Ala Lys Ser Ala Ile Ala Ala Gln Pro Ala Met Glu Asn Thr Gly Ala
            740                 745                 750
Ala Phe Val Gln Asp Met Asp Asn Met Leu Ala Lys His Asn Ala Tyr
        755                 760                 765
Ile Arg Asp Ala Gly Thr Asp Leu Pro Glu Val Asn Asp Trp Gln Trp
    770                 775                 780
Lys Gly Leu Lys
785
```

<210> 17
<211> 2367
<212> ADN
<213> Lactobacillus plantarum

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2364)

<400> 17

```
atg aca aca gat tac tca tca cca gca tat ttg caa aaa gtt gat aag      48
Met Thr Thr Asp Tyr Ser Ser Pro Ala Tyr Leu Gln Lys Val Asp Lys
1               5                   10                  15
tac tgg cgt gct gcc aac tac tta tca gtt ggt caa ctt tat tta aaa      96
Tyr Trp Arg Ala Ala Asn Tyr Leu Ser Val Gly Gln Leu Tyr Leu Lys
            20                  25                  30
gat aat cca cta tta caa cgg cca ttg aag gcc agt gac gtt aag gtt     144
Asp Asn Pro Leu Leu Gln Arg Pro Leu Lys Ala Ser Asp Val Lys Val
        35                  40                  45
cat cca att ggt cac tgg ggg acg att gcc ggt caa aac ttt atc tat     192
His Pro Ile Gly His Trp Gly Thr Ile Ala Gly Gln Asn Phe Ile Tyr
    50                  55                  60
gct cat ctt aac cgg gtc atc aac aag tac ggt ttg aag atg ttc tac     240
Ala His Leu Asn Arg Val Ile Asn Lys Tyr Gly Leu Lys Met Phe Tyr
65                  70                  75                  80
gtt gaa ggt cca ggt cat ggt ggt caa gtg atg gtt tca aac tct tac     288
Val Glu Gly Pro Gly His Gly Gly Gln Val Met Val Ser Asn Ser Tyr
                85                  90                  95
ctt gac ggt act tac acc gat att tat cca gaa att acg cag gat gtt     336
Leu Asp Gly Thr Tyr Thr Asp Ile Tyr Pro Glu Ile Thr Gln Asp Val
```

```
                100                 105                 110
gaa ggg atg caa aag ctc ttc aag caa ttc tca ttc cca ggt ggg gtt      384
Glu Gly Met Gln Lys Leu Phe Lys Gln Phe Ser Phe Pro Gly Gly Val
        115                 120                 125
gct tcc cat gcg gca cct gaa aca ccc ggt tca atc cac gaa ggt ggc      432
Ala Ser His Ala Ala Pro Glu Thr Pro Gly Ser Ile His Glu Gly Gly
    130                 135                 140
gaa ctt ggt tac tca att tca cac ggg gtt ggg gca att ctt gac aat      480
Glu Leu Gly Tyr Ser Ile Ser His Gly Val Gly Ala Ile Leu Asp Asn
145                 150                 155                 160
cct gac gaa atc gcc gcg gtt gtt gtt ggt gat ggg gaa tcc gaa acg      528
Pro Asp Glu Ile Ala Ala Val Val Val Gly Asp Gly Glu Ser Glu Thr
                165                 170                 175
ggt cca tta gca act tca tgg caa tca acg aag ttc att aac cca atc      576
Gly Pro Leu Ala Thr Ser Trp Gln Ser Thr Lys Phe Ile Asn Pro Ile
            180                 185                 190
aac gac ggg gct gtt tta cca atc ttg aac tta aat ggt ttt aag att      624
Asn Asp Gly Ala Val Leu Pro Ile Leu Asn Leu Asn Gly Phe Lys Ile
        195                 200                 205
tct aat cca acg att ttt ggt cgg act tct gat gct aag att aag gaa      672
Ser Asn Pro Thr Ile Phe Gly Arg Thr Ser Asp Ala Lys Ile Lys Glu
    210                 215                 220
tac ttc gaa agc atg aat tgg gaa cca atc ttc gtt gaa ggt gac gat      720
Tyr Phe Glu Ser Met Asn Trp Glu Pro Ile Phe Val Glu Gly Asp Asp
225                 230                 235                 240
cct gaa aag gtt cac cca gcc tta gct aag gcc atg gat gaa gcc gtt      768
Pro Glu Lys Val His Pro Ala Leu Ala Lys Ala Met Asp Glu Ala Val
                245                 250                 255
gaa aag atc aag gca atc cag aag cat gct cgc gaa aat aac gat gca      816
Glu Lys Ile Lys Ala Ile Gln Lys His Ala Arg Glu Asn Asn Asp Ala
            260                 265                 270
aca ttg cca gta tgg cca atg atc gtc ttc cgc gca cct aag ggc tgg      864
Thr Leu Pro Val Trp Pro Met Ile Val Phe Arg Ala Pro Lys Gly Trp
        275                 280                 285
act ggt ccg aag tca tgg gac ggt gat aag atc gaa ggt tca ttc cgt      912
Thr Gly Pro Lys Ser Trp Asp Gly Asp Lys Ile Glu Gly Ser Phe Arg
    290                 295                 300
gct cat caa att ccg att cct gtt gat caa aat gac atg gaa cat gcg      960
Ala His Gln Ile Pro Ile Pro Val Asp Gln Asn Asp Met Glu His Ala
305                 310                 315                 320
gat gct tta gtt gat tgg ctc gaa tca tat caa cca aaa gaa ctc ttc     1008
Asp Ala Leu Val Asp Trp Leu Glu Ser Tyr Gln Pro Lys Glu Leu Phe
                325                 330                 335
aat gaa gat ggc tct ttg aag gat gat att aaa gaa att att cct act     1056
Asn Glu Asp Gly Ser Leu Lys Asp Asp Ile Lys Glu Ile Ile Pro Thr
            340                 345                 350
ggg gac agt cgg atg gct gct aac cca atc acc aat ggt ggg gtc gat     1104
```

```
Gly Asp Ser Arg Met Ala Ala Asn Pro Ile Thr Asn Gly Gly Val Asp
        355                 360                 365
ccg aaa gcc ttg aac tta cca aac ttc cgt gat tat gcg gtc gat acg     1152
Pro Lys Ala Leu Asn Leu Pro Asn Phe Arg Asp Tyr Ala Val Asp Thr
    370                 375                 380
tcc aaa gaa ggc gcg aat gtt aag caa gat atg atc gtt tgg tca gac     1200
Ser Lys Glu Gly Ala Asn Val Lys Gln Asp Met Ile Val Trp Ser Asp
385                 390                 395                 400
tat ttg cgg gat gtc atc aag aaa aat cct gat aac ttc cgg ttg ttc     1248
Tyr Leu Arg Asp Val Ile Lys Lys Asn Pro Asp Asn Phe Arg Leu Phe
                405                 410                 415
gga cct gat gaa acc atg tct aac cgt tta tat ggt gtc ttc gaa acc     1296
Gly Pro Asp Glu Thr Met Ser Asn Arg Leu Tyr Gly Val Phe Glu Thr
            420                 425                 430
act aat cgt caa tgg atg gaa gac att cat cca gat agt gac caa tat     1344
Thr Asn Arg Gln Trp Met Glu Asp Ile His Pro Asp Ser Asp Gln Tyr
        435                 440                 445
gaa gca cca gct ggc cgg gtc tta gat gct cag tta tct gaa cac caa     1392
Glu Ala Pro Ala Gly Arg Val Leu Asp Ala Gln Leu Ser Glu His Gln
    450                 455                 460
gct gaa ggt tgg tta gaa ggt tac gtc tta act gga cgt cat ggg tta     1440
Ala Glu Gly Trp Leu Glu Gly Tyr Val Leu Thr Gly Arg His Gly Leu
465                 470                 475                 480
ttt gcc agt tat gaa gcc ttc cta cgc gtt gtg gac tca atg ttg acg     1488
Phe Ala Ser Tyr Glu Ala Phe Leu Arg Val Val Asp Ser Met Leu Thr
                485                 490                 495
caa cac ttc aag tgg tta cgt aaa gcc aat gaa ctt gat tgg cgt aaa     1536
Gln His Phe Lys Trp Leu Arg Lys Ala Asn Glu Leu Asp Trp Arg Lys
            500                 505                 510
aag tac cca tca ctt aac att atc gcg gct tca act gta ttc caa caa     1584
Lys Tyr Pro Ser Leu Asn Ile Ile Ala Ala Ser Thr Val Phe Gln Gln
        515                 520                 525
gac cat aat ggt tat acc cac caa gat cca ggt gca tta act cat ttg     1632
Asp His Asn Gly Tyr Thr His Gln Asp Pro Gly Ala Leu Thr His Leu
    530                 535                 540
gcc gaa aag aaa cca gaa tac att cgt gaa tat tta cca gcc gat gcc     1680
Ala Glu Lys Lys Pro Glu Tyr Ile Arg Glu Tyr Leu Pro Ala Asp Ala
545                 550                 555                 560
aac acg tta tta gct gtc ggt gac gtc att ttc cgg agc caa gaa aag     1728
Asn Thr Leu Leu Ala Val Gly Asp Val Ile Phe Arg Ser Gln Glu Lys
                565                 570                 575
atc aac tac gtg gtt acg tca aaa cac cca cgt caa caa tgg ttc agc     1776
Ile Asn Tyr Val Val Thr Ser Lys His Pro Arg Gln Gln Trp Phe Ser
            580                 585                 590
att gaa gaa gct aag caa tta gtt gac aat ggt ctt ggt atc att gat     1824
Ile Glu Glu Ala Lys Gln Leu Val Asp Asn Gly Leu Gly Ile Ile Asp
        595                 600                 605
```

```
tgg gca agt acg gac caa ggt agc gaa cca gac att gtc ttt gca gct     1872
Trp Ala Ser Thr Asp Gln Gly Ser Glu Pro Asp Ile Val Phe Ala Ala
    610                 615                 620
gct ggg acg gaa cca acg ctt gaa acg ttg gct gcc atc caa tta cta     1920
Ala Gly Thr Glu Pro Thr Leu Glu Thr Leu Ala Ala Ile Gln Leu Leu
625                 630                 635                 640
cac gac agt ttc cca gag atg aag att cgt ttc gtg aac gtg gtc gac     1968
His Asp Ser Phe Pro Glu Met Lys Ile Arg Phe Val Asn Val Val Asp
                645                 650                 655
atc ttg aag tta cgt agt cct gaa aag gat ccg cgg ggc ttg tca gat     2016
Ile Leu Lys Leu Arg Ser Pro Glu Lys Asp Pro Arg Gly Leu Ser Asp
            660                 665                 670
gct gag ttt gac cat tac ttt act aag gac aaa cca gtg gtc ttt gct     2064
Ala Glu Phe Asp His Tyr Phe Thr Lys Asp Lys Pro Val Val Phe Ala
        675                 680                 685
ttc cac ggt tac gaa gac tta gtt cgt gac atc ttc ttt gat cgt cac     2112
Phe His Gly Tyr Glu Asp Leu Val Arg Asp Ile Phe Phe Asp Arg His
    690                 695                 700
aac cat aac tta tac gtc cac ggt tac cgt gaa aat ggt gat att acc     2160
Asn His Asn Leu Tyr Val His Gly Tyr Arg Glu Asn Gly Asp Ile Thr
705                 710                 715                 720
aca cca ttc gac gta cgg gtc atg aac cag atg gac cgc ttc gac tta     2208
Thr Pro Phe Asp Val Arg Val Met Asn Gln Met Asp Arg Phe Asp Leu
                725                 730                 735
gct aag tcg gca att gcg gcg caa cca gca atg gaa aac act ggt gcg     2256
Ala Lys Ser Ala Ile Ala Ala Gln Pro Ala Met Glu Asn Thr Gly Ala
            740                 745                 750
gcc ttc gtt caa tcc atg gat aat atg ctt gct aaa cac aat gcc tat     2304
Ala Phe Val Gln Ser Met Asp Asn Met Leu Ala Lys His Asn Ala Tyr
        755                 760                 765
atc cgg gat gcc gga act gac ttg cca gaa gtt aat gat tgg caa tgg     2352
Ile Arg Asp Ala Gly Thr Asp Leu Pro Glu Val Asn Asp Trp Gln Trp
    770                 775                 780
aag ggt tta aaa taa                                               2367
Lys Gly Leu Lys
785
```

<210> 18
<211> 788
<212> PRT
<213> Lactobacillus plantarum

<400> 18

```
Met Thr Thr Asp Tyr Ser Ser Pro Ala Tyr Leu Gln Lys Val Asp Lys
1               5                   10                  15
Tyr Trp Arg Ala Ala Asn Tyr Leu Ser Val Gly Gln Leu Tyr Leu Lys
```

```
            20                  25                  30
Asp Asn Pro Leu Leu Gln Arg Pro Leu Lys Ala Ser Asp Val Lys Val
        35                  40                  45
His Pro Ile Gly His Trp Gly Thr Ile Ala Gly Gln Asn Phe Ile Tyr
    50                  55                  60
Ala His Leu Asn Arg Val Ile Asn Lys Tyr Gly Leu Lys Met Phe Tyr
65                  70                  75                  80
Val Glu Gly Pro Gly His Gly Gly Gln Val Met Val Ser Asn Ser Tyr
                85                  90                  95
Leu Asp Gly Thr Tyr Thr Asp Ile Tyr Pro Glu Ile Thr Gln Asp Val
            100                 105                 110
Glu Gly Met Gln Lys Leu Phe Lys Gln Phe Ser Phe Pro Gly Gly Val
        115                 120                 125
Ala Ser His Ala Ala Pro Glu Thr Pro Gly Ser Ile His Glu Gly Gly
    130                 135                 140
Glu Leu Gly Tyr Ser Ile Ser His Gly Val Gly Ala Ile Leu Asp Asn
145                 150                 155                 160
Pro Asp Glu Ile Ala Ala Val Val Val Gly Asp Gly Glu Ser Glu Thr
                165                 170                 175
Gly Pro Leu Ala Thr Ser Trp Gln Ser Thr Lys Phe Ile Asn Pro Ile
            180                 185                 190
Asn Asp Gly Ala Val Leu Pro Ile Leu Asn Leu Asn Gly Phe Lys Ile
        195                 200                 205
Ser Asn Pro Thr Ile Phe Gly Arg Thr Ser Asp Ala Lys Ile Lys Glu
    210                 215                 220
Tyr Phe Glu Ser Met Asn Trp Glu Pro Ile Phe Val Glu Gly Asp Asp
225                 230                 235                 240
Pro Glu Lys Val His Pro Ala Leu Ala Lys Ala Met Asp Glu Ala Val
                245                 250                 255
Glu Lys Ile Lys Ala Ile Gln Lys His Ala Arg Glu Asn Asn Asp Ala
            260                 265                 270
Thr Leu Pro Val Trp Pro Met Ile Val Phe Arg Ala Pro Lys Gly Trp
        275                 280                 285
Thr Gly Pro Lys Ser Trp Asp Gly Asp Lys Ile Glu Gly Ser Phe Arg
    290                 295                 300
Ala His Gln Ile Pro Ile Pro Val Asp Gln Asn Asp Met Glu His Ala
305                 310                 315                 320
Asp Ala Leu Val Asp Trp Leu Glu Ser Tyr Gln Pro Lys Glu Leu Phe
                325                 330                 335
Asn Glu Asp Gly Ser Leu Lys Asp Asp Ile Lys Glu Ile Ile Pro Thr
            340                 345                 350
Gly Asp Ser Arg Met Ala Ala Asn Pro Ile Thr Asn Gly Gly Val Asp
        355                 360                 365
Pro Lys Ala Leu Asn Leu Pro Asn Phe Arg Asp Tyr Ala Val Asp Thr
    370                 375                 380
Ser Lys Glu Gly Ala Asn Val Lys Gln Asp Met Ile Val Trp Ser Asp
385                 390                 395                 400
```

Tyr Leu Arg Asp Val Ile Lys Lys Asn Pro Asp Asn Phe Arg Leu Phe
405 410 415
Gly Pro Asp Glu Thr Met Ser Asn Arg Leu Tyr Gly Val Phe Glu Thr
420 425 430
Thr Asn Arg Gln Trp Met Glu Asp Ile His Pro Asp Ser Asp Gln Tyr
435 440 445
Glu Ala Pro Ala Gly Arg Val Leu Asp Ala Gln Leu Ser Glu His Gln
450 455 460
Ala Glu Gly Trp Leu Glu Gly Tyr Val Leu Thr Gly Arg His Gly Leu
465 470 475 480
Phe Ala Ser Tyr Glu Ala Phe Leu Arg Val Val Asp Ser Met Leu Thr
485 490 495
Gln His Phe Lys Trp Leu Arg Lys Ala Asn Glu Leu Asp Trp Arg Lys
500 505 510
Lys Tyr Pro Ser Leu Asn Ile Ile Ala Ala Ser Thr Val Phe Gln Gln
515 520 525
Asp His Asn Gly Tyr Thr His Gln Asp Pro Gly Ala Leu Thr His Leu
530 535 540
Ala Glu Lys Lys Pro Glu Tyr Ile Arg Glu Tyr Leu Pro Ala Asp Ala
545 550 555 560
Asn Thr Leu Leu Ala Val Gly Asp Val Ile Phe Arg Ser Gln Glu Lys
565 570 575
Ile Asn Tyr Val Val Thr Ser Lys His Pro Arg Gln Gln Trp Phe Ser
580 585 590
Ile Glu Glu Ala Lys Gln Leu Val Asp Asn Gly Leu Gly Ile Ile Asp
595 600 605
Trp Ala Ser Thr Asp Gln Gly Ser Glu Pro Asp Ile Val Phe Ala Ala
610 615 620
Ala Gly Thr Glu Pro Thr Leu Glu Thr Leu Ala Ala Ile Gln Leu Leu
625 630 635 640
His Asp Ser Phe Pro Glu Met Lys Ile Arg Phe Val Asn Val Val Asp
645 650 655
Ile Leu Lys Leu Arg Ser Pro Glu Lys Asp Pro Arg Gly Leu Ser Asp
660 665 670
Ala Glu Phe Asp His Tyr Phe Thr Lys Asp Lys Pro Val Val Phe Ala
675 680 685
Phe His Gly Tyr Glu Asp Leu Val Arg Asp Ile Phe Phe Asp Arg His
690 695 700
Asn His Asn Leu Tyr Val His Gly Tyr Arg Glu Asn Gly Asp Ile Thr
705 710 715 720
Thr Pro Phe Asp Val Arg Val Met Asn Gln Met Asp Arg Phe Asp Leu
725 730 735
Ala Lys Ser Ala Ile Ala Ala Gln Pro Ala Met Glu Asn Thr Gly Ala
740 745 750
Ala Phe Val Gln Ser Met Asp Asn Met Leu Ala Lys His Asn Ala Tyr
755 760 765
Ile Arg Asp Ala Gly Thr Asp Leu Pro Glu Val Asn Asp Trp Gln Trp

770 775 780
Lys Gly Leu Lys
785

<210> 19
<211> 2660
<212> ADN
<213> Bifidobacterium lactis

<220>
<221> CDS
<222> (128)..(2602)

<400> 19
aggtcagcgt attcgcgtaa cataatcagc gatcgggcac ggagaccggc ctgcaggaca 60
gcgccgaagc ccgtgcccaa cggaataaac aaatcgcaca tttatgtgca ggagtacagg 120
agcacac atg act aat cct gtt att ggt acc cca tgg cag aag ctg gat 169
Met Thr Asn Pro Val Ile Gly Thr Pro Trp Gln Lys Leu Asp
1 5 10
cgt ccg gtt tcc gaa gag gcc atc gaa ggc atg gac aag tac tgg cgc 217
Arg Pro Val Ser Glu Glu Ala Ile Glu Gly Met Asp Lys Tyr Trp Arg
15 20 25 30
gtc gcc aac tac atg tct atc ggc cag atc tac ctg cgt agc aac ccg 265
Val Ala Asn Tyr Met Ser Ile Gly Gln Ile Tyr Leu Arg Ser Asn Pro
35 40 45
ctg atg aag gag ccc ttc acc cgc gat gac gtg aag cac cgt ctg gtc 313
Leu Met Lys Glu Pro Phe Thr Arg Asp Asp Val Lys His Arg Leu Val
50 55 60
ggc cac tgg ggc acc acc ccg ggc ctg aac ttc ctt ctc gcc cac atc 361
Gly His Trp Gly Thr Thr Pro Gly Leu Asn Phe Leu Leu Ala His Ile
65 70 75
aac cgc ctg atc gcc gat cac cag cag aac acc gtg ttc atc atg ggt 409
Asn Arg Leu Ile Ala Asp His Gln Gln Asn Thr Val Phe Ile Met Gly
80 85 90
cct ggc cac ggc ggc cct gca ggt acc gct cag tcc tac atc gac ggc 457
Pro Gly His Gly Gly Pro Ala Gly Thr Ala Gln Ser Tyr Ile Asp Gly
95 100 105 110
acc tac acc gag tac tac ccg aac atc acc aag gac gaa gct ggc ctg 505
Thr Tyr Thr Glu Tyr Tyr Pro Asn Ile Thr Lys Asp Glu Ala Gly Leu
115 120 125
cag aag ttc ttc cgc cag ttc tcc tac ccg ggt ggc att cct tcc cac 553
Gln Lys Phe Phe Arg Gln Phe Ser Tyr Pro Gly Gly Ile Pro Ser His
130 135 140
ttc gct ccg gag acg ccg ggc tcc atc cac gaa ggc ggc gag ctg ggc 601
Phe Ala Pro Glu Thr Pro Gly Ser Ile His Glu Gly Gly Glu Leu Gly

```
        145                 150                 155
tac gcc ctg tcg cac gcc tac ggc gcg atc atg gac aac ccg agc ctc      649
Tyr Ala Leu Ser His Ala Tyr Gly Ala Ile Met Asp Asn Pro Ser Leu
    160                 165                 170
ttc gtc ccg tgc atc atc ggt gac ggc gaa gcc gag acc ggc cct ctg      697
Phe Val Pro Cys Ile Ile Gly Asp Gly Glu Ala Glu Thr Gly Pro Leu
175                 180                 185                 190
gcc acc ggc tgg cag tcc aac aag ctc gtc aac ccg cgc acc gac ggc      745
Ala Thr Gly Trp Gln Ser Asn Lys Leu Val Asn Pro Arg Thr Asp Gly
                195                 200                 205
atc gtc ctg ccg atc ctg cac ctc aac ggc tac aag atc gcc aac ccg      793
Ile Val Leu Pro Ile Leu His Leu Asn Gly Tyr Lys Ile Ala Asn Pro
            210                 215                 220
acg atc ctc gcc cgc atc tcc gac gag gag ctg cac gac ttc ttc cgc      841
Thr Ile Leu Ala Arg Ile Ser Asp Glu Glu Leu His Asp Phe Phe Arg
        225                 230                 235
ggc atg ggt tac cac ccg tac gag ttc gtc gcc ggc ttc gac aac gag      889
Gly Met Gly Tyr His Pro Tyr Glu Phe Val Ala Gly Phe Asp Asn Glu
    240                 245                 250
gat cac ctg tcg atc cac cgt cgc ttc gcc gag ctc ttc gag acc atc      937
Asp His Leu Ser Ile His Arg Arg Phe Ala Glu Leu Phe Glu Thr Ile
255                 260                 265                 270
ttc gac gag atc tgc gat atc aag gct gcg gct cag acc gac gac atg      985
Phe Asp Glu Ile Cys Asp Ile Lys Ala Ala Ala Gln Thr Asp Asp Met
                275                 280                 285
acc cgt ccg ttc tac ccg atg ctc atc ttc cgc acc ccg aag ggc tgg     1033
Thr Arg Pro Phe Tyr Pro Met Leu Ile Phe Arg Thr Pro Lys Gly Trp
            290                 295                 300
acc tgc ccg aag ttc atc gac ggc aag aag acc gaa ggc tcc tgg cgt     1081
Thr Cys Pro Lys Phe Ile Asp Gly Lys Lys Thr Glu Gly Ser Trp Arg
        305                 310                 315
gca cac cag gtc ccg ctg gct tcc gcc cgc gac acc gag gcc cac ttc     1129
Ala His Gln Val Pro Leu Ala Ser Ala Arg Asp Thr Glu Ala His Phe
    320                 325                 330
gaa gtc ctc aag ggc tgg atg gaa tcc tac aag ccg gag gag ctc ttc     1177
Glu Val Leu Lys Gly Trp Met Glu Ser Tyr Lys Pro Glu Glu Leu Phe
335                 340                 345                 350
aac gcc gac ggc tcc atc aag gag gac gtc acc gca ttc atg cct aag     1225
Asn Ala Asp Gly Ser Ile Lys Glu Asp Val Thr Ala Phe Met Pro Lys
                355                 360                 365
ggc gaa ctg cgc atc ggc gcc aac ccg aat gcc aac ggc ggc cgc atc     1273
Gly Glu Leu Arg Ile Gly Ala Asn Pro Asn Ala Asn Gly Gly Arg Ile
            370                 375                 380
cgc gag gat ctg aag ctc cct gag ctc gat cag tac gag atc acc ggc     1321
Arg Glu Asp Leu Lys Leu Pro Glu Leu Asp Gln Tyr Glu Ile Thr Gly
        385                 390                 395
gtc aag gaa tac ggc cac ggt tgg ggc cag gtc gag gct ccg cgt tcc     1369
```

```
Val Lys Glu Tyr Gly His Gly Trp Gly Gln Val Glu Ala Pro Arg Ser
    400                 405                 410
ctc ggc gcg tac tgc cgc gac atc atc aag aac aac ccg gat tcg ttc      1417
Leu Gly Ala Tyr Cys Arg Asp Ile Ile Lys Asn Asn Pro Asp Ser Phe
415                 420                 425                 430
cgc gtc ttc gga cct gac gag acc gcg tcc aac cgt ctg aac gcg acc      1465
Arg Val Phe Gly Pro Asp Glu Thr Ala Ser Asn Arg Leu Asn Ala Thr
                435                 440                 445
tac gag gtc acc aag aag cag tgg gac aac gga tac ctc tcg gct ctc      1513
Tyr Glu Val Thr Lys Lys Gln Trp Asp Asn Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
            450                 455                 460
gtc gac gag aac atg gcc gtc acc ggc cag gtt gtc gag cag ctc tcc      1561
Val Asp Glu Asn Met Ala Val Thr Gly Gln Val Val Glu Gln Leu Ser
        465                 470                 475
gag cat cag tgc gaa ggc ttc ctc gag gcc tac ctg ctc acc ggc cgt      1609
Glu His Gln Cys Glu Gly Phe Leu Glu Ala Tyr Leu Leu Thr Gly Arg
    480                 485                 490
cac ggc atc tgg agc tcc tac gag tcc ttc gtg cac gtg atc gac tcc      1657
His Gly Ile Trp Ser Ser Tyr Glu Ser Phe Val His Val Ile Asp Ser
495                 500                 505                 510
atg ctg aac cag cat gcg aag tgg ctc gag gcc acc gtc cgc gag atc      1705
Met Leu Asn Gln His Ala Lys Trp Leu Glu Ala Thr Val Arg Glu Ile
                515                 520                 525
ccg tgg cgt aag ccg atc tcc tcg gtg aac ctc ctg gtc tcc tcg cac      1753
Pro Trp Arg Lys Pro Ile Ser Ser Val Asn Leu Leu Val Ser Ser His
            530                 535                 540
gtg tgg cgt cag gat cac aac ggc ttc tcg cac cag gat ccg ggt gtg      1801
Val Trp Arg Gln Asp His Asn Gly Phe Ser His Gln Asp Pro Gly Val
        545                 550                 555
acc tcc gtc ctg ctg aac aag acg ttc aac aac gac cac gtg acg aac      1849
Thr Ser Val Leu Leu Asn Lys Thr Phe Asn Asn Asp His Val Thr Asn
    560                 565                 570
atc tac ttc gcg acc gat gcc aac atg ctg ctg gcc atc gcc gag aag      1897
Ile Tyr Phe Ala Thr Asp Ala Asn Met Leu Leu Ala Ile Ala Glu Lys
575                 580                 585                 590
tgc ttc aag tcc acc aac aag atc aac gca atc ttc gcc ggc aag cag      1945
Cys Phe Lys Ser Thr Asn Lys Ile Asn Ala Ile Phe Ala Gly Lys Gln
                595                 600                 605
ccg gcc gcg acg tgg atc acc ctc gac gag gta cgc gcc gag ctc gag      1993
Pro Ala Ala Thr Trp Ile Thr Leu Asp Glu Val Arg Ala Glu Leu Glu
            610                 615                 620
gct ggt gcc gcc gag tgg aag tgg gct tcc aac gcc aag agc aac gac      2041
Ala Gly Ala Ala Glu Trp Lys Trp Ala Ser Asn Ala Lys Ser Asn Asp
        625                 630                 635
gag gtc cag gtt gtc ctc gcc gcc gcc ggc gac gtc ccg acc cag gag      2089
Glu Val Gln Val Val Leu Ala Ala Ala Gly Asp Val Pro Thr Gln Glu
    640                 645                 650
```

```
atc atg gcc gct tcc gat gcc ctc aac aag atg ggc atc aag ttc aag     2137
Ile Met Ala Ala Ser Asp Ala Leu Asn Lys Met Gly Ile Lys Phe Lys
655                 660                 665                 670
gtc gtc aac gtc gtg gac ctc atc aag ctg cag tcc tcg aag gag aac     2185
Val Val Asn Val Val Asp Leu Ile Lys Leu Gln Ser Ser Lys Glu Asn
                675                 680                 685
gac gag gcc atg tct gac gag gac ttc gcc gac ctg ttc acc gcg gac     2233
Asp Glu Ala Met Ser Asp Glu Asp Phe Ala Asp Leu Phe Thr Ala Asp
            690                 695                 700
aag ccg gtc ctc ttc gcc tac cac tcc tat gcc cag gac gtt cgt ggc     2281
Lys Pro Val Leu Phe Ala Tyr His Ser Tyr Ala Gln Asp Val Arg Gly
        705                 710                 715
ctc atc tac gac cgc ccg aac cac gac aac ttc acc gtt gtc gga tac     2329
Leu Ile Tyr Asp Arg Pro Asn His Asp Asn Phe Thr Val Val Gly Tyr
    720                 725                 730
aag gag cag ggc tcc acg acg acg ccg ttc gac atg gtg cgt gtc aac     2377
Lys Glu Gln Gly Ser Thr Thr Thr Pro Phe Asp Met Val Arg Val Asn
735                 740                 745                 750
gac atg gat cgc tac gcc ctt cag gcc aag gcc ctc gag ctc atc gac     2425
Asp Met Asp Arg Tyr Ala Leu Gln Ala Lys Ala Leu Glu Leu Ile Asp
                755                 760                 765
gcc gac aag tat gcc gac aag atc aac gag ctc aac gag ttc cgc aag     2473
Ala Asp Lys Tyr Ala Asp Lys Ile Asn Glu Leu Asn Glu Phe Arg Lys
            770                 775                 780
acc gcg ttc cag ttc gcc gtc gac aat ggc tat gac att cct gag ttc     2521
Thr Ala Phe Gln Phe Ala Val Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Pro Glu Phe
        785                 790                 795
acc gat tgg gtg tac ccg gat gtc aag gtc gac gag acc tcc atg ctc     2569
Thr Asp Trp Val Tyr Pro Asp Val Lys Val Asp Glu Thr Ser Met Leu
    800                 805                 810
tcc gcc acc gcc gcg acc gcc ggc gac aac gag tgagcatagt ctcatcgctt   2622
Ser Ala Thr Ala Ala Thr Ala Gly Asp Asn Glu
815                 820                 825
agccgatgaa aggcccgggt gtccgcaccc gggccttt                           2660
```

<210> 20
<211> 825
<212> PRT
<213> Bifidobacterium lactis

<400> 20

```
Met Thr Asn Pro Val Ile Gly Thr Pro Trp Gln Lys Leu Asp Arg Pro
1               5                   10                  15
Val Ser Glu Glu Ala Ile Glu Gly Met Asp Lys Tyr Trp Arg Val Ala
            20                  25                  30
Asn Tyr Met Ser Ile Gly Gln Ile Tyr Leu Arg Ser Asn Pro Leu Met
```

```
        35                  40                  45
Lys Glu Pro Phe Thr Arg Asp Asp Val Lys His Arg Leu Val Gly His
    50                  55                  60
Trp Gly Thr Thr Pro Gly Leu Asn Phe Leu Leu Ala His Ile Asn Arg
65                  70                  75                  80
Leu Ile Ala Asp His Gln Gln Asn Thr Val Phe Ile Met Gly Pro Gly
                85                  90                  95
His Gly Gly Pro Ala Gly Thr Ala Gln Ser Tyr Ile Asp Gly Thr Tyr
            100                 105                 110
Thr Glu Tyr Tyr Pro Asn Ile Thr Lys Asp Glu Ala Gly Leu Gln Lys
        115                 120                 125
Phe Phe Arg Gln Phe Ser Tyr Pro Gly Gly Ile Pro Ser His Phe Ala
    130                 135                 140
Pro Glu Thr Pro Gly Ser Ile His Glu Gly Gly Glu Leu Gly Tyr Ala
145                 150                 155                 160
Leu Ser His Ala Tyr Gly Ala Ile Met Asp Asn Pro Ser Leu Phe Val
                165                 170                 175
Pro Cys Ile Ile Gly Asp Gly Glu Ala Glu Thr Gly Pro Leu Ala Thr
            180                 185                 190
Gly Trp Gln Ser Asn Lys Leu Val Asn Pro Arg Thr Asp Gly Ile Val
        195                 200                 205
Leu Pro Ile Leu His Leu Asn Gly Tyr Lys Ile Ala Asn Pro Thr Ile
    210                 215                 220
Leu Ala Arg Ile Ser Asp Glu Glu Leu His Asp Phe Phe Arg Gly Met
225                 230                 235                 240
Gly Tyr His Pro Tyr Glu Phe Val Ala Gly Phe Asp Asn Glu Asp His
                245                 250                 255
Leu Ser Ile His Arg Arg Phe Ala Glu Leu Phe Glu Thr Ile Phe Asp
            260                 265                 270
Glu Ile Cys Asp Ile Lys Ala Ala Ala Gln Thr Asp Asp Met Thr Arg
        275                 280                 285
Pro Phe Tyr Pro Met Leu Ile Phe Arg Thr Pro Lys Gly Trp Thr Cys
    290                 295                 300
Pro Lys Phe Ile Asp Gly Lys Lys Thr Glu Gly Ser Trp Arg Ala His
305                 310                 315                 320
Gln Val Pro Leu Ala Ser Ala Arg Asp Thr Glu Ala His Phe Glu Val
                325                 330                 335
Leu Lys Gly Trp Met Glu Ser Tyr Lys Pro Glu Glu Leu Phe Asn Ala
            340                 345                 350
Asp Gly Ser Ile Lys Glu Asp Val Thr Ala Phe Met Pro Lys Gly Glu
        355                 360                 365
Leu Arg Ile Gly Ala Asn Pro Asn Ala Asn Gly Gly Arg Ile Arg Glu
    370                 375                 380
Asp Leu Lys Leu Pro Glu Leu Asp Gln Tyr Glu Ile Thr Gly Val Lys
385                 390                 395                 400
Glu Tyr Gly His Gly Trp Gly Gln Val Glu Ala Pro Arg Ser Leu Gly
                405                 410                 415
```

Ala Tyr Cys Arg Asp Ile Ile Lys Asn Asn Pro Asp Ser Phe Arg Val
420 425 430
Phe Gly Pro Asp Glu Thr Ala Ser Asn Arg Leu Asn Ala Thr Tyr Glu
435 440 445
Val Thr Lys Lys Gln Trp Asp Asn Gly Tyr Leu Ser Ala Leu Val Asp
450 455 460
Glu Asn Met Ala Val Thr Gly Gln Val Val Glu Gln Leu Ser Glu His
465 470 475 480
Gln Cys Glu Gly Phe Leu Glu Ala Tyr Leu Leu Thr Gly Arg His Gly
485 490 495
Ile Trp Ser Ser Tyr Glu Ser Phe Val His Val Ile Asp Ser Met Leu
500 505 510
Asn Gln His Ala Lys Trp Leu Glu Ala Thr Val Arg Glu Ile Pro Trp
515 520 525
Arg Lys Pro Ile Ser Ser Val Asn Leu Leu Val Ser Ser His Val Trp
530 535 540
Arg Gln Asp His Asn Gly Phe Ser His Gln Asp Pro Gly Val Thr Ser
545 550 555 560
Val Leu Leu Asn Lys Thr Phe Asn Asn Asp His Val Thr Asn Ile Tyr
565 570 575
Phe Ala Thr Asp Ala Asn Met Leu Leu Ala Ile Ala Glu Lys Cys Phe
580 585 590
Lys Ser Thr Asn Lys Ile Asn Ala Ile Phe Ala Gly Lys Gln Pro Ala
595 600 605
Ala Thr Trp Ile Thr Leu Asp Glu Val Arg Ala Glu Leu Glu Ala Gly
610 615 620
Ala Ala Glu Trp Lys Trp Ala Ser Asn Ala Lys Ser Asn Asp Glu Val
625 630 635 640
Gln Val Val Leu Ala Ala Ala Gly Asp Val Pro Thr Gln Glu Ile Met
645 650 655
Ala Ala Ser Asp Ala Leu Asn Lys Met Gly Ile Lys Phe Lys Val Val
660 665 670
Asn Val Val Asp Leu Ile Lys Leu Gln Ser Ser Lys Glu Asn Asp Glu
675 680 685
Ala Met Ser Asp Glu Asp Phe Ala Asp Leu Phe Thr Ala Asp Lys Pro
690 695 700
Val Leu Phe Ala Tyr His Ser Tyr Ala Gln Asp Val Arg Gly Leu Ile
705 710 715 720
Tyr Asp Arg Pro Asn His Asp Asn Phe Thr Val Val Gly Tyr Lys Glu
725 730 735
Gln Gly Ser Thr Thr Thr Pro Phe Asp Met Val Arg Val Asn Asp Met
740 745 750
Asp Arg Tyr Ala Leu Gln Ala Lys Ala Leu Glu Leu Ile Asp Ala Asp
755 760 765
Lys Tyr Ala Asp Lys Ile Asn Glu Leu Asn Glu Phe Arg Lys Thr Ala
770 775 780
Phe Gln Phe Ala Val Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Pro Glu Phe Thr Asp

```
785                 790                 795                 800
Trp Val Tyr Pro Asp Val Lys Val Asp Glu Thr Ser Met Leu Ser Ala
                805                 810                 815
Thr Ala Ala Thr Ala Gly Asp Asn Glu
            820                 825
```

<210> 21
<211> 1386
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1383)

<400> 21

```
atg tct gac aca ccg acc tca gct ctg atc acc acg gtc aac cgc agc      48
Met Ser Asp Thr Pro Thr Ser Ala Leu Ile Thr Thr Val Asn Arg Ser
1               5                   10                  15
ttc gat gga ttc gat ttg gaa gaa gta gca gca gac ctt gga gtt cgg      96
Phe Asp Gly Phe Asp Leu Glu Glu Val Ala Ala Asp Leu Gly Val Arg
            20                  25                  30
ctc acc tac ctg ccc gac gaa gaa cta gaa gta tcc aaa gtt ctc gcg     144
Leu Thr Tyr Leu Pro Asp Glu Glu Leu Glu Val Ser Lys Val Leu Ala
        35                  40                  45
gcg gac ctc ctc gct gag ggg cca gct ctc atc atc ggt gta gga aac     192
Ala Asp Leu Leu Ala Glu Gly Pro Ala Leu Ile Ile Gly Val Gly Asn
    50                  55                  60
acg ttt ttc gac gcc cag gtc gcc gct gcc ctc ggc gtc cca gtg cta     240
Thr Phe Phe Asp Ala Gln Val Ala Ala Ala Leu Gly Val Pro Val Leu
65                  70                  75                  80
ctg ctg gta gac aag caa ggc aag cac gtt gct ctt gct cgc acc cag     288
Leu Leu Val Asp Lys Gln Gly Lys His Val Ala Leu Ala Arg Thr Gln
                85                  90                  95
gta aac aat gcc ggc gca gtt gtt gca gca gca ttt acc gct gaa caa     336
Val Asn Asn Ala Gly Ala Val Val Ala Ala Ala Phe Thr Ala Glu Gln
            100                 105                 110
gag cca atg ccg gat aag ctg cgc aag gct gtg cgc aac cac agc aac     384
Glu Pro Met Pro Asp Lys Leu Arg Lys Ala Val Arg Asn His Ser Asn
        115                 120                 125
ctc gaa cca gtc atg agc gcc gaa ctc ttt gaa aac tgg ctg ctc aag     432
Leu Glu Pro Val Met Ser Ala Glu Leu Phe Glu Asn Trp Leu Leu Lys
    130                 135                 140
cgc gca cgc gca gag cac tcc cac att gtg ctg cca gaa ggt gac gac     480
Arg Ala Arg Ala Glu His Ser His Ile Val Leu Pro Glu Gly Asp Asp
```

```
145                 150                 155                 160
gac cgc atc ttg atg gct gcc cac cag ctg ctt gat caa gac atc tgt      528
Asp Arg Ile Leu Met Ala Ala His Gln Leu Leu Asp Gln Asp Ile Cys
                165                 170                 175
gac atc acg atc ctg ggc gat cca gta aag atc aag gag cgc gct acc      576
Asp Ile Thr Ile Leu Gly Asp Pro Val Lys Ile Lys Glu Arg Ala Thr
            180                 185                 190
gaa ctt ggc ctg cac ctt aac act gca tac ctg gtc aat ccg ctg aca      624
Glu Leu Gly Leu His Leu Asn Thr Ala Tyr Leu Val Asn Pro Leu Thr
        195                 200                 205
gat cct cgc ctg gag gaa ttc gcc gaa caa ttc gcg gag ctg cgc aag      672
Asp Pro Arg Leu Glu Glu Phe Ala Glu Gln Phe Ala Glu Leu Arg Lys
    210                 215                 220
tca aag agc gtc act atc gat gaa gcc cgc gaa atc atg aag gat att      720
Ser Lys Ser Val Thr Ile Asp Glu Ala Arg Glu Ile Met Lys Asp Ile
225                 230                 235                 240
tcc tac ttc ggc acc atg atg gtc cac aac ggc gac gcc gac gga atg      768
Ser Tyr Phe Gly Thr Met Met Val His Asn Gly Asp Ala Asp Gly Met
                245                 250                 255
gta tcc ggt gca gca aac acc acc gca cac acc att aag cca agc ttc      816
Val Ser Gly Ala Ala Asn Thr Thr Ala His Thr Ile Lys Pro Ser Phe
            260                 265                 270
cag atc atc aaa act gtt cca gaa gca tcc gtc gtt tct tcc atc ttc      864
Gln Ile Ile Lys Thr Val Pro Glu Ala Ser Val Val Ser Ser Ile Phe
        275                 280                 285
ctc atg gtg ctg cgc ggg cga ctg tgg gca ttc ggc gac tgt gct gtt      912
Leu Met Val Leu Arg Gly Arg Leu Trp Ala Phe Gly Asp Cys Ala Val
    290                 295                 300
aac ccg aac cca act gct gaa cag ctt ggt gaa atc gcc gtt gtg tca      960
Asn Pro Asn Pro Thr Ala Glu Gln Leu Gly Glu Ile Ala Val Val Ser
305                 310                 315                 320
gca aaa act gca gca caa ttt ggc att gat cct cgc gta gcc atc ttg     1008
Ala Lys Thr Ala Ala Gln Phe Gly Ile Asp Pro Arg Val Ala Ile Leu
                325                 330                 335
tcc tac tcc act ggc aac tcc ggc gga ggc tca gat gtg gat cgc gcc     1056
Ser Tyr Ser Thr Gly Asn Ser Gly Gly Gly Ser Asp Val Asp Arg Ala
            340                 345                 350
atc gac gct ctt gca gaa gca cgc cga ctt aac cca gaa cta tgc gtc     1104
Ile Asp Ala Leu Ala Glu Ala Arg Arg Leu Asn Pro Glu Leu Cys Val
        355                 360                 365
gat gga cca ctt cag ttc gac gcc gcc gtc gac ccg ggt gtg gcg cgc     1152
Asp Gly Pro Leu Gln Phe Asp Ala Ala Val Asp Pro Gly Val Ala Arg
    370                 375                 380
aag aag atg cca gac tct gac gtc gct ggc cag gca aat gtg ttt atc     1200
Lys Lys Met Pro Asp Ser Asp Val Ala Gly Gln Ala Asn Val Phe Ile
385                 390                 395                 400
ttc cct gac ctg gaa gcc gga aac atc ggc tac aaa act gca caa cgc     1248
```

```
Phe Pro Asp Leu Glu Ala Gly Asn Ile Gly Tyr Lys Thr Ala Gln Arg
                405                 410                 415
acc ggt cac gcc ctg gca gtt ggt ccg att ctg cag ggc cta aac aaa      1296
Thr Gly His Ala Leu Ala Val Gly Pro Ile Leu Gln Gly Leu Asn Lys
            420                 425                 430
cca gtc aac gac ctt tcc cgt ggc gca aca gtc cct gac atc gtc aac      1344
Pro Val Asn Asp Leu Ser Arg Gly Ala Thr Val Pro Asp Ile Val Asn
        435                 440                 445
aca gta gcc atc aca gca att cag gca gga gga cgc agc taa              1386
Thr Val Ala Ile Thr Ala Ile Gln Ala Gly Gly Arg Ser
    450                 455                 460
```

<210> 22
<211> 461
<212> PRT
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 22

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

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

<210> 23
<211> 2644
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<221> CDS
<222> (1214)..(2641)

<400> 23

```
ttccaaagtc tggcacacga ggtcctgaga cttggaatca cgacgagcct gctccgaagc     60
tgcatcgtaa tcaatgtcct cagggttcac gatcacctcg atggtgtcgg aatgatcaag    120
ttccttcagt tccaacggag tgaacttcgc ctgagcaggt ccacgacgac caaaaacgtg    180
cacttcctta gcctgattct tagccaagct ctcatagaca ttgtcaggga tttcagtaac    240
```

```
tagcagctca tcgccagtct tcgccaaaat acgagcaacg tccaacgcca cgttaccgac    300
accaacaacc gctaccttct cagcagaaag atcccagttg cgttcaaagt tcggattgcc    360
atcatagaaa ccaacgaact cgccagcgcc ccacgaacct tccagatcag aacctggaac    420
ccgaagatcc tggtcgccag tagcgccagt ggagaacacg atcgcgtcat aaaactcacg    480
caactcctca acagtgatgt ccttgccgac ctcaatgttg cccaagaaac gcagctgctc    540
cttgtccatc acattgtgca gggacttcac gatgcccttg atgcgagggt gatcaggcgc    600
aacaccataa cggatcaaac cgaaaggcgc tggcatgcgt tcaaaaagat caatctgcac    660
gtccgtgtcg gatttcatca acaaatcaga cgcgtagatt cctgctggac ctgcaccgac    720
aacggcaaca cgcaaagggc gagacatata aagttcgatt ccttaaaggg gttctaaaaa    780
atgtggagta tgtgagcggg gttccactag tagattcgac tcctatcggg gtgcgactgc    840
taatggtgcc ctgctatcaa ccctccatga tacgtggtaa gtgcagacta ataaaggcca    900
gtcggggagt attgggggct ttgctggggg cagatttgtc acgctgcgcg ctttcataga    960
ccccattaat gtggggtgaa gagctgtaaa gtaccgctaa aaactttgca aagggtgctt   1020
cgcaacttgt aaccgctccg tattgtttte tacggcaata agcatttgtg ctgctcaaag   1080
cgtggaattg agatcggttt gaaaattaca aaataaaact ttgcaaaccg ggctgtacgc   1140
aaggcggacg aacgctaaac tatgtaagaa atcacaactt cccctcagta gtgccaggag   1200
gcacaagcct gaa gtg tca tca atg aga agg ttc agg ctg aaa cta gaa       1249
                Val Ser Ser Met Arg Arg Phe Arg Leu Lys Leu Glu
                1               5                   10
agg cga tgt atg tct gac aca ccg acc tca gct ctg atc acc acg gtc     1297
Arg Arg Cys Met Ser Asp Thr Pro Thr Ser Ala Leu Ile Thr Thr Val
        15                  20                  25
aac cgc agc ttc gat gga ttc gat ttg gaa gaa gta gca gca gac ctt     1345
Asn Arg Ser Phe Asp Gly Phe Asp Leu Glu Glu Val Ala Ala Asp Leu
    30                  35                  40
gga gtt cgg ctc acc gac ctg ccc gac gaa gaa cta gaa gta tcc aaa     1393
Gly Val Arg Leu Thr Asp Leu Pro Asp Glu Glu Leu Glu Val Ser Lys
45                  50                  55                  60
gtt ctc gcg gcg gac ctc ctc gct gag ggg cca gct ctc atc atc ggt     1441
Val Leu Ala Ala Asp Leu Leu Ala Glu Gly Pro Ala Leu Ile Ile Gly
                65                  70                  75
gta gga aac acg ttt ttc gac gcc cag gtc gcc gct gcc ctc ggc gtc     1489
Val Gly Asn Thr Phe Phe Asp Ala Gln Val Ala Ala Ala Leu Gly Val
            80                  85                  90
cca gtg cta ctg ctg gta gac aag caa ggc aag cac gtt gct ctt gct     1537
Pro Val Leu Leu Leu Val Asp Lys Gln Gly Lys His Val Ala Leu Ala
        95                  100                 105
cgc acc cag gta aac aat gcc ggc gca gtt gtt gca gca gca ttt acc     1585
Arg Thr Gln Val Asn Asn Ala Gly Ala Val Val Ala Ala Ala Phe Thr
    110                 115                 120
gct gaa caa gag cca atg ccg gat aag ctg cgc aag gct gtg cgc aac     1633
Ala Glu Gln Glu Pro Met Pro Asp Lys Leu Arg Lys Ala Val Arg Asn
125                 130                 135                 140
cac agc aac ctc gaa cca gtc atg agc gcc gaa ctc ttt gaa aac tgg     1681
His Ser Asn Leu Glu Pro Val Met Ser Ala Glu Leu Phe Glu Asn Trp
                145                 150                 155
ctg ctc aag cgc gca cgc gca gag cac tcc cac att gtg ctg cca gaa     1729
```

```
Leu Leu Lys Arg Ala Arg Ala Glu His Ser His Ile Val Leu Pro Glu
            160                 165                 170
ggt gac gac gac cgc atc ttg atg gct gcc cac cag ctg ctt gat caa     1777
Gly Asp Asp Asp Arg Ile Leu Met Ala Ala His Gln Leu Leu Asp Gln
        175                 180                 185
gac atc tgt gac atc acg atc ctg ggc gat cca gta cag atc aag gag     1825
Asp Ile Cys Asp Ile Thr Ile Leu Gly Asp Pro Val Gln Ile Lys Glu
    190                 195                 200
cgc gct acc gaa ctt ggc ctg cac ctt aac act gca tac ctg gtc aat     1873
Arg Ala Thr Glu Leu Gly Leu His Leu Asn Thr Ala Tyr Leu Val Asn
205                 210                 215                 220
ccg ctg aca gat cct cgc ctg gag gaa ttc gcc gaa caa ttc gcg gag     1921
Pro Leu Thr Asp Pro Arg Leu Glu Glu Phe Ala Glu Gln Phe Ala Glu
                225                 230                 235
ctg cgc aag tca aag agc gtc act atc gat gaa gcc cgc gaa atc atg     1969
Leu Arg Lys Ser Lys Ser Val Thr Ile Asp Glu Ala Arg Glu Ile Met
            240                 245                 250
aag gat att tgc tac ttc ggc acc atg atg gtc cac aac ggc gac gcc     2017
Lys Asp Ile Cys Tyr Phe Gly Thr Met Met Val His Asn Gly Asp Ala
        255                 260                 265
gac gga atg gta tcc ggt gca gca aac acc acc gca cac acc att aag     2065
Asp Gly Met Val Ser Gly Ala Ala Asn Thr Thr Ala His Thr Ile Lys
    270                 275                 280
cca agc ttc cag atc atc aaa act gtt cca gaa gca tcc gtc gtt tct     2113
Pro Ser Phe Gln Ile Ile Lys Thr Val Pro Glu Ala Ser Val Val Ser
285                 290                 295                 300
tcc atc ttc ctc atg gtg ctg cgc ggg cga ctg tgg gca ttc ggc gac     2161
Ser Ile Phe Leu Met Val Leu Arg Gly Arg Leu Trp Ala Phe Gly Asp
                305                 310                 315
tgt gct gtt aac ccg aac cca act gct gaa cag ctt ggt gaa atc gcc     2209
Cys Ala Val Asn Pro Asn Pro Thr Ala Glu Gln Leu Gly Glu Ile Ala
            320                 325                 330
gtt gtg tca gca aaa act gca gca caa ttt ggc att gat cct cgc gta     2257
Val Val Ser Ala Lys Thr Ala Ala Gln Phe Gly Ile Asp Pro Arg Val
        335                 340                 345
gcc atc ttg tcc tac tcc act ggc aac tcc ggc gga ggc tca gat gtg     2305
Ala Ile Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Asn Ser Gly Gly Gly Ser Asp Val
    350                 355                 360
gat cgc gcc atc gac gct ctt gca gaa gca cgc cga ctt aac cca gaa     2353
Asp Arg Ala Ile Asp Ala Leu Ala Glu Ala Arg Arg Leu Asn Pro Glu
365                 370                 375                 380
cta tgc gtc gat gga cca ctt cag ttc gac gcc gcc gtc gac ccg ggt     2401
Leu Cys Val Asp Gly Pro Leu Gln Phe Asp Ala Ala Val Asp Pro Gly
                385                 390                 395
gtg gcg cgc aag aag atg cca gac tct gac gtc gct ggc cag gca aat     2449
Val Ala Arg Lys Lys Met Pro Asp Ser Asp Val Ala Gly Gln Ala Asn
            400                 405                 410
```

```
gtg ttt atc ttc cct gac ctg gaa gcc gga aac atc ggc tac aaa act     2497
Val Phe Ile Phe Pro Asp Leu Glu Ala Gly Asn Ile Gly Tyr Lys Thr
        415                 420                 425
gca caa cgc acc ggt cac gcc ctg gca gtt ggt ccg att ctg cag ggc     2545
Ala Gln Arg Thr Gly His Ala Leu Ala Val Gly Pro Ile Leu Gln Gly
    430                 435                 440
cta aac aaa cca gtc aac gac ctt tcc cgt ggc gca aca gtc cct gac     2593
Leu Asn Lys Pro Val Asn Asp Leu Ser Arg Gly Ala Thr Val Pro Asp
445                 450                 455                 460
atc gtc aac aca gta gcc atc aca gca att cag gca gga gga cgc agc     2641
Ile Val Asn Thr Val Ala Ile Thr Ala Ile Gln Ala Gly Gly Arg Ser
                465                 470                 475
taa                                                                2644
```

<210> 24
<211> 476
<212> PRT
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 24

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

Leu Gly Leu His Leu Asn Thr Ala Tyr Leu Val Asn Pro Leu Thr Asp
210 215 220
Pro Arg Leu Glu Glu Phe Ala Glu Gln Phe Ala Glu Leu Arg Lys Ser
225 230 235 240
Lys Ser Val Thr Ile Asp Glu Ala Arg Glu Ile Met Lys Asp Ile Cys
245 250 255
Tyr Phe Gly Thr Met Met Val His Asn Gly Asp Ala Asp Gly Met Val
260 265 270
Ser Gly Ala Ala Asn Thr Thr Ala His Thr Ile Lys Pro Ser Phe Gln
275 280 285
Ile Ile Lys Thr Val Pro Glu Ala Ser Val Val Ser Ser Ile Phe Leu
290 295 300
Met Val Leu Arg Gly Arg Leu Trp Ala Phe Gly Asp Cys Ala Val Asn
305 310 315 320
Pro Asn Pro Thr Ala Glu Gln Leu Gly Glu Ile Ala Val Val Ser Ala
325 330 335
Lys Thr Ala Ala Gln Phe Gly Ile Asp Pro Arg Val Ala Ile Leu Ser
340 345 350
Tyr Ser Thr Gly Asn Ser Gly Gly Gly Ser Asp Val Asp Arg Ala Ile
355 360 365
Asp Ala Leu Ala Glu Ala Arg Arg Leu Asn Pro Glu Leu Cys Val Asp
370 375 380
Gly Pro Leu Gln Phe Asp Ala Ala Val Asp Pro Gly Val Ala Arg Lys
385 390 395 400
Lys Met Pro Asp Ser Asp Val Ala Gly Gln Ala Asn Val Phe Ile Phe
405 410 415
Pro Asp Leu Glu Ala Gly Asn Ile Gly Tyr Lys Thr Ala Gln Arg Thr
420 425 430
Gly His Ala Leu Ala Val Gly Pro Ile Leu Gln Gly Leu Asn Lys Pro
435 440 445
Val Asn Asp Leu Ser Arg Gly Ala Thr Val Pro Asp Ile Val Asn Thr
450 455 460
Val Ala Ile Thr Ala Ile Gln Ala Gly Gly Arg Ser
465 470 475

<210> 25
<211> 37
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi

<400> 25
cggggtacct ataaagttcg attccttaaa ggggttc 37

<210> 26
<211> 38
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi

<400> 26
cgcggatccg tgccaatgcc attagctgcg tcctcctg 38

<210> 27
<211> 1063
<212> ADN
<213> Escherichia coli

<220>
<221> CDS
<222> (201)..(860)

<400> 27
cccgcttcga cctgcaaatc tatcccacga agcgcctgaa cgccgcctgg ataggttttt 60
ttaagctgtt gaagttccag tgcaatggtc ataaattttt acttaccttа cgttcttaca 120
ctttatctgt ggtttaaatc gtcccggagt tgccctatat tagccaaacg taattatttg 180
gttacaggtc gttaacctcc atg aaa gac ata gat aca ctc atc agc aac aat 233
Met Lys Asp Ile Asp Thr Leu Ile Ser Asn Asn
1 5 10
gca cta tgg tca aaa atg ctg gtg gaa gag gat ccc ggg ttt ttt gag 281
Ala Leu Trp Ser Lys Met Leu Val Glu Glu Asp Pro Gly Phe Phe Glu
15 20 25
aaa ctg gca caa gcg caa aaa ccg cgc ttt cta tgg att gga tgt tcc 329
Lys Leu Ala Gln Ala Gln Lys Pro Arg Phe Leu Trp Ile Gly Cys Ser
30 35 40
gac agt cgc gtt cct gca gaa cgt tta acc ggt ctt gag ccg ggc gaa 377
Asp Ser Arg Val Pro Ala Glu Arg Leu Thr Gly Leu Glu Pro Gly Glu
45 50 55
ctc ttt gtt cac cgt aat gtt gct aac ctg gtc att cac act gac ctg 425
Leu Phe Val His Arg Asn Val Ala Asn Leu Val Ile His Thr Asp Leu
60 65 70 75
aac tgc ctt tcc gtg gtt cag tat gca gtg gat gta ctc gaa gtt gaa 473
Asn Cys Leu Ser Val Val Gln Tyr Ala Val Asp Val Leu Glu Val Glu
80 85 90
cac att att atc tgt ggc cac tac ggt tgc ggc ggc gta caa gcc gca 521
His Ile Ile Ile Cys Gly His Tyr Gly Cys Gly Gly Val Gln Ala Ala
95 100 105

```
gtt gaa aac ccg gaa ctg ggg ctt atc aac aac tgg ctg ctg cat atc      569
Val Glu Asn Pro Glu Leu Gly Leu Ile Asn Asn Trp Leu Leu His Ile
        110                 115                 120
cgc gat atc tgg ttc aaa cat agc tca ttg ctc ggc gaa atg ccg caa      617
Arg Asp Ile Trp Phe Lys His Ser Ser Leu Leu Gly Glu Met Pro Gln
    125                 130                 135
gag cgc cgt ctg gat acc ttg tgt gaa ctg aac gtc atg gaa cag gtg      665
Glu Arg Arg Leu Asp Thr Leu Cys Glu Leu Asn Val Met Glu Gln Val
140                 145                 150                 155
tat aac ctg ggc cac tcc acc att atg caa tca gcg tgg aaa cgc ggg      713
Tyr Asn Leu Gly His Ser Thr Ile Met Gln Ser Ala Trp Lys Arg Gly
                160                 165                 170
cag aaa gtt acc att cac ggc tgg gcc tac ggc att cac gac ggc ttg      761
Gln Lys Val Thr Ile His Gly Trp Ala Tyr Gly Ile His Asp Gly Leu
            175                 180                 185
ctg cgt gat ctg gat gtt acc gcc acc aac cgc gaa acc ctt gag caa      809
Leu Arg Asp Leu Asp Val Thr Ala Thr Asn Arg Glu Thr Leu Glu Gln
        190                 195                 200
cgt tac cgt cac ggg att tcc aac ctc aag ctg aaa cac gcc aac cac      857
Arg Tyr Arg His Gly Ile Ser Asn Leu Lys Leu Lys His Ala Asn His
    205                 210                 215
aaa taaaaatgcc atgccggatg caacacatcc ggcaacttca cacttactcg           910
Lys
220
tccagcagaa tcactttgcc gatatacggc agatgacggt aacgctgtgc gtaatcaatg    970
ccgtaaccca ccacaaactc atccgggatc gagaaaccga taaattctac cgggacgttc   1030
acttcacgac gggacggttt atccagcagc gta                                1063
```

<210> 28
<211> 220
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 28

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

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

<210> 29
<211> 1060
<212> ADN
<213> Escherichia coli

<220>
<221> CDS
<222> (201)..(857)

<400> 29

```
gcaggttggg agacgtgcaa cgcactggcg gcacgggtga agctgccatg ttcagccacg      60
gcaagaaaat aattgatatg tcgagagagc attcgcaacc tataagtaaa tccaatggaa     120
ctcatcataa atgagacttt taccttatga caatcggcga gtagtctgcc tctcattcca     180
gagacagaca gaggttaacg gtg aaa gag att att gat gga ttc ctt aaa ttc     233
                      Val Lys Glu Ile Ile Asp Gly Phe Leu Lys Phe
                      1               5                  10
cag cgc gag gca ttt ccg aag cgg gaa gcc ttg ttt aaa cag ctg gcg      281
Gln Arg Glu Ala Phe Pro Lys Arg Glu Ala Leu Phe Lys Gln Leu Ala
            15                  20                  25
aca cag caa agc ccg cgc aca ctt ttt atc tcc tgc tcc gac agc cgt      329
Thr Gln Gln Ser Pro Arg Thr Leu Phe Ile Ser Cys Ser Asp Ser Arg
        30                  35                  40
ctg gtc cct gag ctg gtg acg caa cgt gag cct ggc gat ctg ttc gtt      377
Leu Val Pro Glu Leu Val Thr Gln Arg Glu Pro Gly Asp Leu Phe Val
    45                  50                  55
att cgc aac gcg ggc aat atc gtc cct tcc tac ggg ccg gaa ccc ggt      425
Ile Arg Asn Ala Gly Asn Ile Val Pro Ser Tyr Gly Pro Glu Pro Gly
60                  65                  70                  75
```

```
ggc gtt tct gct tcg gtg gag tat gcc gtc gct gcg ctt cgg gta tct      473
Gly Val Ser Ala Ser Val Glu Tyr Ala Val Ala Ala Leu Arg Val Ser
                80                  85                  90
gac att gtg att tgt ggt cat tcc aac tgt ggc gcg atg acc gcc att      521
Asp Ile Val Ile Cys Gly His Ser Asn Cys Gly Ala Met Thr Ala Ile
            95                  100                 105
gcc agc tgt cag tgc atg gac cat atg cct gcc gtc tcc cac tgg ctg      569
Ala Ser Cys Gln Cys Met Asp His Met Pro Ala Val Ser His Trp Leu
        110                 115                 120
cgt tat gcc gat tca gcc cgc gtc gtt aat gag gcg cgc ccg cat tcc      617
Arg Tyr Ala Asp Ser Ala Arg Val Val Asn Glu Ala Arg Pro His Ser
    125                 130                 135
gat tta ccg tca aaa gct gcg gcg atg gta cgt gaa aac gtc att gct      665
Asp Leu Pro Ser Lys Ala Ala Ala Met Val Arg Glu Asn Val Ile Ala
140                 145                 150                 155
cag ttg gct aat ttg caa act cat cca tcg gtg cgc ctg gcg ctc gaa      713
Gln Leu Ala Asn Leu Gln Thr His Pro Ser Val Arg Leu Ala Leu Glu
                160                 165                 170
gag ggg cgg atc gcc ctg cac ggc tgg gtc tac gac att gaa agc ggc      761
Glu Gly Arg Ile Ala Leu His Gly Trp Val Tyr Asp Ile Glu Ser Gly
            175                 180                 185
agc atc gca gct ttt gac ggc gca acc cgc cag ttt gtg cca ctg gcc      809
Ser Ile Ala Ala Phe Asp Gly Ala Thr Arg Gln Phe Val Pro Leu Ala
        190                 195                 200
gct aat cct cgc gtt tgt gcc ata ccg cta cgc caa ccg acc gca gcg      857
Ala Asn Pro Arg Val Cys Ala Ile Pro Leu Arg Gln Pro Thr Ala Ala
    205                 210                 215
taaccttatt tttaaaccat caggagttcc accatgattc agtcacaaat taaccgcaat    917
attcgtcttg atcttgccga tgccattttg ctcagcaaag ctaaaaaaga tctctcattt    977
gccgagattg ccgacggcac cggtctggca gaagcctttg taaccgcggc tttgctgggt   1037
cagcaggcgc ttcctgccga cgc                                           1060
```

<210> 30
<211> 219
<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 30

```
Val Lys Glu Ile Ile Asp Gly Phe Leu Lys Phe Gln Arg Glu Ala Phe
1               5                  10                  15
Pro Lys Arg Glu Ala Leu Phe Lys Gln Leu Ala Thr Gln Gln Ser Pro
            20                  25                  30
Arg Thr Leu Phe Ile Ser Cys Ser Asp Ser Arg Leu Val Pro Glu Leu
        35                  40                  45
Val Thr Gln Arg Glu Pro Gly Asp Leu Phe Val Ile Arg Asn Ala Gly
```

```
    50                  55                  60
Asn Ile Val Pro Ser Tyr Gly Pro Glu Pro Gly Gly Val Ser Ala Ser
65                  70                  75                  80
Val Glu Tyr Ala Val Ala Ala Leu Arg Val Ser Asp Ile Val Ile Cys
                85                  90                  95
Gly His Ser Asn Cys Gly Ala Met Thr Ala Ile Ala Ser Cys Gln Cys
            100                 105                 110
Met Asp His Met Pro Ala Val Ser His Trp Leu Arg Tyr Ala Asp Ser
        115                 120                 125
Ala Arg Val Val Asn Glu Ala Arg Pro His Ser Asp Leu Pro Ser Lys
    130                 135                 140
Ala Ala Ala Met Val Arg Glu Asn Val Ile Ala Gln Leu Ala Asn Leu
145                 150                 155                 160
Gln Thr His Pro Ser Val Arg Leu Ala Leu Glu Glu Gly Arg Ile Ala
                165                 170                 175
Leu His Gly Trp Val Tyr Asp Ile Glu Ser Gly Ser Ile Ala Ala Phe
            180                 185                 190
Asp Gly Ala Thr Arg Gln Phe Val Pro Leu Ala Ala Asn Pro Arg Val
        195                 200                 205
Cys Ala Ile Pro Leu Arg Gln Pro Thr Ala Ala
    210                 215
```