

Biochemiczne, genetyczne i technologiczne podstawy biosyntezy L-lizyny

Jadwiga Gołąbczak

Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności,
Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka, Łódź

L-lysine biosynthesis

Summary

Amino acid fermentation has grown into a global industry. Market development has been particularly dynamic for the flavor-enhancer glutamate and animal feed amino acids: L-lysine, DL-methionine, L-threonine, and L-tryptophan. These amino acids are manufactured using high performance *Corynebacterium glutamicum*. Production strains have been traditionally constructed by repeating random mutation and selection. This classical method has generated a variety of mutation, such as auxotrophs, analog-resistant mutants and transport mutants. The complete genome sequence of the wild-type strain of *C. glutamicum* has been established and analysed to improve the understanding of the molecular biology and physiology of this organism. A novel methodology that merges genomics with classical strains improvement has been developed and applied for the reconstruction of classically derived production strains. In addition, modern technologies such as metabolic flux analysis and metabolic control analysis have enabled quantification of carbon fluxes. The fundamental information obtained has been the basis for further strain improvement.

Adres do korespondencji

Jadwiga Gołąbczak,
Instytut Biochemii
Technicznej,
Wydział Biotechnologii
i Nauk o Żywności,
Politechnika Łódzka,
ul. Stefanowskiego 4/10,
90-924 Łódź.

Key words:

Corynebacterium glutamicum, strain development, L-lysine fermentation.

1. Wstęp

Aminokwasy reprezentują ważną grupę pierwotnych metabolitów, stosowanych w przemyśle spożywczym, paszowym, farmaceutycznym, kosmetycznym i chemicznym. Wartość ich sprze-

daży przekroczyła w 2004 r. cztery i pół miliarda dolarów i wykazuje stałą tendencję wzrostową, wynoszącą 5-10% rocznie (1).

Aktualna światowa produkcja L-aminokwasów znacznie przekracza 2 mln ton/rok. Wykorzystuje się mikrobiologiczną syntezę przy udziale rosnących komórek szczepów produkcyjnych, a także metodę syntezy enzymatycznej bądź chemicznej. Metodą enzymatyczną otrzymuje się przede wszystkim kwas L-asparaginowy (w reakcji aminacji kwasu fumarowego katalizowanej przez amoniako-liazę L-asparaginianu) oraz tryptofan z seryny i indolu (2). Synteza chemiczna pozwala otrzymać wyłącznie formy DL-aminokwasów, co stwarza problem rozdzielenia powstałej mieszaniny do enancjomerów. Znalazła ona zastosowanie głównie w produkcji DL-metioniny (350 tys. ton/rok). Najpowszechniej stosowanym sposobem otrzymywania aminokwasów jest mikrobiologiczna synteza. W grupie aminokwasów syntetyzowanych tą metodą pierwsze miejsce zajmuje kwas L-glutaminowy (1,5 mln ton rocznie), kolejne przypada L-lizynie (850 tys. ton rocznie) (1).

Głównym odbiorcą kwasu L-glutaminowego jest przemysł spożywczy. Glutaminian sodu, dodawany do różnych produktów w ilości 0,1-0,4%, wzmacnia ich smakowość, a sam wywołuje wrażenie smakowe określone jako umami. Innymi przykładami aminokwasów stosowanych w przemyśle spożywczym są L-asparaginian i L-fenylalanina, produkowane w ilości około 10 tys. ton/rok i używane do produkcji słodziku (aspartamu) oraz L-glicyna, dodawana do niego w celu zamaskowania posmaku sacharyny.

Dominującym aminokwasem, wykorzystywanym przez przemysł paszowy jest L-lizyna. Wynika to z faktu, że lizyna jest aminokwasem ograniczającym wartość biologiczną wielu białek roślinnych, np. pszenicy, kukurydzy (3). Jej niedobór w pożywieniu powoduje, m.in., zahamowanie wzrostu zwierząt hodowlanych, zanik mięśni, zakłócenie biosyntezy białek, odwapnienie kości. Dodawanie L-lizyny do paszy zwierząt (0,1-0,4%) poprawia wykorzystanie białka paszowego, co przynosi wymierne korzyści ekonomiczne. Wzrastające pogłowie zwierząt hodowlanych (bydła, świń i drobiu) i stosunkowo niska cena handlowych preparatów L-lizyny zwiększają zainteresowanie tym aminokwasem: w ciągu dwóch ostatnich dekad, światowy popyt na L-lizynę wzrósł niemal 20 razy, do poziomu 850 tys. ton w 2005 r. (1).

Pasze zwierząt, oprócz L-lizyny, uzupełniane są także w DL-metioninę i L-treoninę. Światową, roczną produkcję L-treoniny szacuje się na 15 tysięcy ton.

Przemysł farmaceutyczny wykorzystuje L-aminokwasy głównie jako składniki płynów fizjologicznych. Niektóre aminokwasy są stosowane bezpośrednio w lecznictwie, np. L-tryptofan jest środkiem przeciwdepresyjnym. Aminokwasy pełnią ponadto rolę substratów w syntezach rozmaitych leków, są składnikami kosmetyków, past do zębów, szamponów i detergentów.

Powszechnie znanymi producentami aminokwasów są firmy japońskie (Ajinomoto Kyowa Hakko), koreańskie (Cheil-Jedang), amerykańskie (Archer Daniels Midland – ADM), chińskie (Global BioChem) i niemieckie (Degussa i BASF) (1). Ważnymi dostawcami kwasu L-glutaminowego są przedsiębiorstwa azjatyckie (Chiny, Tajlandia), natomiast $\frac{1}{3}$ światowej produkcji L-lizyny skoncentrowana jest w USA.

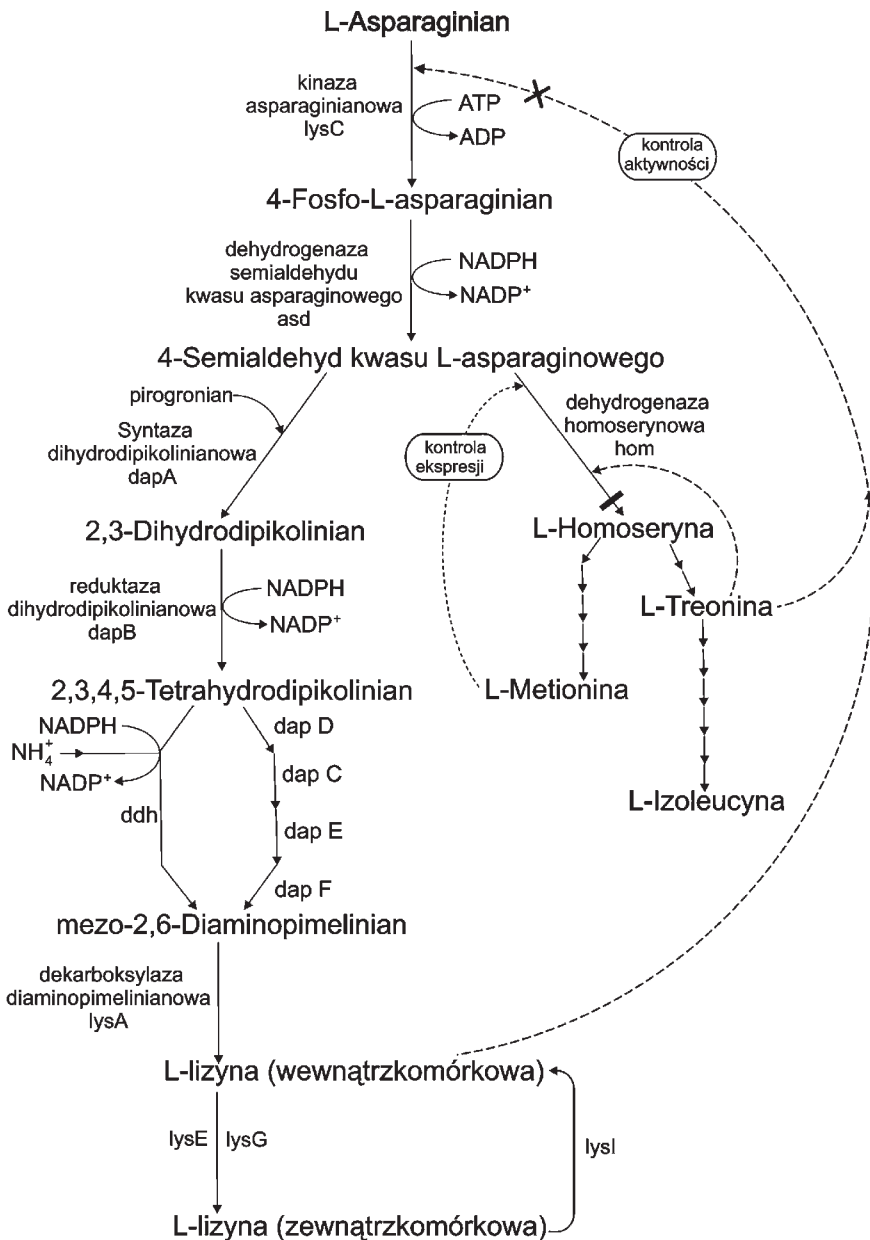
2. Charakterystyka szczepów lizynotwórczych

Najczęściej do syntezy L-lizyny wykorzystywane są bakterie *Corynebacterium glutamicum*. Stosowana dotychczas nazwa rodzajowa *Brevibacterium* funkcjonuje ze względów historycznych, formalnie jest to rodzaj *Corynebacterium* (4).

Komórki *C. glutamicum* mają charakterystyczny kształt maczugi (coryne); w części biegunowej komórki znajdują się ziarnistości metachromatyczne powodujące, że ta część jest szersza od pozostałej (5). Charakterystyczną cechą morfologiczną *Corynebacterium* jest zdolność do tworzenia form pleomorficznych, a ze względu na specyfikę podziału poprzecznego komórek (komórki potomne pozostają „przebudowo” połączone za pomocą nieuszkodzonej części zewnętrznej ściany komórkowej – ang. *snapping division*), powstają formy „v”. Bakterie te w bogatych w składniki pokarmowe, płynnych podłożach występują w formach diploidalnych o wymiarach 0,5-1,0 μm , natomiast na podłożu stałym – w postaci nitkowanych pałeczek o długości 1,5-5 μm . Są one gramdodatnie, nie wytwarzają przetrwalników i nie wykazują zdolności do ruchu. Komórki *C. glutamicum* wyróżniają się obecnością unikatowej warstwy lipidowej, otaczającej membranę cytoplazmatyczną. Warstwa ta zawiera rozgałęzione 3-hydroksykwasy tłuszczowe – kwasy mikolinowe i może wpływać na przepuszczalność ściany (6). DNA *C. glutamicum* zawiera 53-55% G + C. Bakterie te mogą rosnąć tak w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych. Są to mezofile, optymalna temperatura dla ich wzrostu wynosi 28-30°C. Zalecanymi źródłami węgla dla hodowli *C. glutamicum* są węglowodany takie jak: sacharoza, glukoza, fruktoza. Bakterie te utylizują także kwasy organiczne i alkohole, natomiast nie hydrolizują skrobi i celulozy. Źródłami azotu mogą być dla nich różne nieorganiczne i organiczne związki: mocznik, amoniak lub sole amonowe, peptony, hydrolizaty białek (np. kazeiny, nasion soi), kiszonki rybne. Szczepy *Corynebacterium* nie wykazują aktywności proteolitycznej. Są one aukstrofami względem biotyny, niektóre wymagają do wzrostu dodatkowo tiaminy. Wspólną cechą *Corynebacterium* jest zdolność do sekrecji kwasu glutaminowego, która jest podstawą do nazwania tych drobnoustrojów „bakteriami glutaminianotwórczymi” (5). Sekrecja aminokwasu zachodzi wyłącznie przy niskim stężeniu biotyny (ok. 2,5 $\mu\text{g} \times \text{dm}^{-3}$), natomiast przy wysokim inicjuje ją dodatek środka powierzchniowo czynnego (np. Tweenu 80) lub antybiotyku (np. penicyliny).

3. Synteza L-lizyny przez *Corynebacterium glutamicum*

C. glutamicum, podobnie jak inne bakterie, syntetyzują L-lizynę, a także L-treoninę, L-metioninę i L-izoleucynę z kwasu L-asparaginowego (rys. 1). Pierwszym wspólnym enzymem w syntezie tych aminokwasów jest kinaza asparaginianowa [EC 2.7.2.4], której aktywność jest allosterycznie hamowana przez dwa efekторы: L-lizynę i L-treoninę (5). Warunkiem uruchomienia mechanizmu kontrolnego kinazy aspa-



Rys. 1. Biosynteza L-lizyny przez *Corynebacterium glutamicum* (33,34). — blokada metaboliczna u mutantów auktotroficznych; X blokada systemu kontroli aktywności enzymu u mutantów regulatorowych AEC^r (opornych na analog L-lizyny- S-(2-aminoetylo)-L-cysteinę), *dapD*, *dapC*, *dapE*, *dapF* – geny N-sukcynylotransferazy tetrahydrodipikolinianowej, transaminazy sukcyndiaminopimelinianowej, desukcynyazy sukcyndiaminopimelinianowej, epimerazy diaminopimelinianowej, *ddh* – gen dehydrogenazy diaminopimelinianowej, *lysE*, *lysG*, *lysI* – geny kodujące syntezę: białka transportującego lizynę z komórek do podłoża, transkrypcyjnego regulatora Lys E, białka transportującego lizynę z podłoża do komórek.

raginianowej jest równoczesna obecność L-lizyny i L-treoniny w nadmiarze. Amino-kwasy te pojedynczo nie wpływają na aktywność enzymu. Gen kinazy asparaginianowej *lysC* składa się z dwóch podjednostek: *lysC α* oraz *lysC β* (7). Transkrypcja podjednostki *lysC α* zachodzi pod kontrolą promotora, który również obniża ekspresję genu *asd* kodującego dehydrogenazę semialdehydu kwasu L-asparaginowego [EC 1.2.1.11]. Transkrypcja podjednostki *lysC β* , jak również genu *asd*, podlega kontroli drugiego promotora zlokalizowanego w obrębie fragmentu *lysCa*. System regulacji kinazy asparaginianowej znajduje się w podjednostce β . Stwierdzono, że tylko przy mutacjach w kodującym regionie tej podjednostki aktywności kinazy asparaginianowej przestają być hamowane przez nadmiar L-lizyny z L-treoniną (8). Inhibujący wpływ tych aminokwasów na działanie kinazy, a tym samym na syntezę lizyny, można także ograniczyć zmniejszając aktywność dehydrogenazy homoserynowej [EC 1.1.1.3], co powoduje obniżenie stężenia L-treoniny do poziomu, który nie wpływa na aktywność kinazy. Również dodatkowe kopie genu *lysC* polepszają produkcję L-lizyny (9).

Kolejnym miejscem kontroli szlaku syntezy L-lizyny jest punkt rozgałęzienia przy semialdehydzie kwasu L-asparaginowego. Aldehyd ten może być przekształcany w homoserynę przez dehydrogenazę homoserynową [EC 1.1.1.3] bądź, razem z pirogronianem, ulegać przekształceniu do L-lizyny przy udziale syntazy dihydrodipikolinianowej [EC 4.2.1.52]. Wiadomo, że syntaza dihydrodipikolinianowa nie podlega kontroli na poziomie genomu, także jej aktywność katalityczna nie jest regulowana, natomiast ekspresja genu dehydrogenazy homoserynowej jest kontrolowana przez L-metioninę, a zbyt wysokie wewnątrzkomórkowe stężenie L-treoniny powoduje allosteryczną inhibicję enzymu przez sprzężenie zwrotne (5). Interesujący jest fakt, że po dodaniu do pożywki leucyny aktywność dehydrogenazy wzrasta ponad dwukrotnie i równocześnie zmniejsza się aktywność syntazy dihydrodipikolinianowej. Jest to zatem przykład kontroli syntezy produktów jednego szlaku enzymatycznego przez produkt odrębnej drogi biosyntezy. Kinetyczne właściwości enzymów konkurujących o dostęp do β -semialdehydu kwasu L-asparaginowego uniemożliwiają wydzielanie lizyny przez dzikie szczepy *C. glutamicum*, bowiem syntaza dihydrodipikolinianowa charakteryzuje się słabym powinowactwem do aldehydu oraz niewielką szybkością reakcji, podczas gdy te same parametry dla dehydrogenazy homoserynowej są o ponad rząd wielkości większe (6). Obniżenie ekspresji genu dehydrogenazy przez metioninę lub zablokowanie działania tego enzymu w wyniku mutagenizacji sprzyja przekształceniu β -semialdehydu kwasu L-asparaginowego do lizyny. Podobny efekt daje zwiększenie aktywności syntazy dihydrodipikolinianowej poprzez nadekspresję jej genu (*dapA*) (6). Wprowadzenie dodatkowej kopii *dapA* metodą międzyrodzajowej koniugacji pomiędzy *Escherichia coli* S-17 i dzikim szczepem *C. glutamicum*, a następnie plazmidów z genem *dapA*, występujących w wielu kopiach, umożliwiło otrzymanie szczepów zawierających w chromosomie 6 oraz 20 kopii genu *dapA*. Pomyślny wynik tych konstrukcji genetycznych został potwierdzony zarówno analizą plazmidowego DNA, jak i techniką hybrydyzacji metodą So-

utherna. Zwielokrotnienie kopii powodowało wzrost aktywności syntazy, czego konsekwencją było znaczne podwyższenie wewnątrzkomórkowego stężenia lizyny, lecz równocześnie ograniczało intensywność wzrostu bakterii. Oznacza to, że działanie tego enzymu wpływa istotnie na produkcję lizyny, aczkolwiek on sam nie podlega żadnemu systemowi kontrolnemu (6).

Gen *dapA* oraz gen *dapB*, kodujący syntezę kolejnego enzymu szlaku biosyntezy lizyny – reduktazy dihydrodipikolinianowej [EC 1.3.1.26] tworzą operon *dapB-orf2-dapA-orf4* (10). Struktura produktu genu *orf4*, jak również konsekwencje jego częściowej inaktywacji sugerują, że *orf4* jest zaangażowany w kontrolę translacji.

Produktem reakcji katalizowanej przez reduktazę dihydrodipikolinianową jest L-1,2,3,4-tetrahydrodipikolinian (11,12). Stanowi on substrat dla dwóch enzymów: N-sukcynylotransferazy tetrahydrodipikolinianowej [EC 2.3.1.117] oraz dehydrogenazy diaminopimelinianowej [EC 1.4.1.16]. Pierwszy z enzymów, kodowany przez gen *dapD*, uczestniczy w czteroetapowym, drugi, kodowany przez gen *ddh*, w jednoetapowym przekształcaniu tetrahydrodipikolinianu do mezo-2,6-diaminopimelinianu (mezo-2,6-diaminoheptanodionianu) – prekursora L-lizyny. Sonntag ze wsp. (13) ustalili dystrybucję związków węgla pomiędzy obydwie drogi syntezy lizyny. Przy udziale drogi z dehydrogenazą wytwarzane było 30% sumarycznej puli aminokwasu, przy czym 70% metabolitów przepływało przez tę drogę na początku procesu biosyntezy aminokwasu. Przepływ ten stopniowo zmniejszał się w miarę wyczerpywania jonów NH_4^+ z podłoża i całkowicie zanikał w końcowej fazie akumulacji lizyny. Było to spowodowane niskim powinowactwem dehydrogenazy względem tych jonów. Jednoetapowa droga z dehydrogenazą nie była wykorzystywana w syntezie lizyny, kiedy NH_4^+ zastąpiono glutaminianem jako źródłem azotu. Oznacza to, że składniki podłoża wywierają bezpośredni wpływ na ten szlak biosyntezy lizyny (14). Energooszczędny wariant z dehydrogenazą funkcjonuje przy wysokim stężeniu jonów amonowych, zaś bardziej energochłonny wariant z sukcynylotransferazą – przy niskiej zawartości tych jonów w podłożu. Amplifikacja genu *ddh* nie wpływała na wzrost komórek, utylizację glukozy, a także na produkcję lizyny. Dotyczyło to zarówno szczepu dysponującego obydwoma drogami, jak i mutanta, który przekształcał tetrahydrodipikolinian w diaminopimelinian wyłącznie przy udziale dehydrogenazy (8,11). Oznacza to, że jednoetapowa droga z dehydrogenazą kompensuje brak drogi syntezy prekursora lizyny z udziałem sukcynylotransferazy.

Produktem reakcji katalizowanej przez sukcynylotransferazę, która inicjuje czteroetapową drogę syntezy diaminopimelinianu, jest N-sukcynylo-2-L-amino-6-oksopimelinian. Związek ten przekształcany jest do N-sukcynylo-LL-2,6-diaminopimelinianu w reakcji aminacji. Donorem grupy aminowej w tej reakcji jest kwas glutaminowy, zaś katalizatorem transaminaza sukcynylo-diaminopimelinianowa [EC 2.6.1.17]. Białko enzymu zawiera fosforan pirydoksalu, a jego syntezę koduje gen *dapC*. Kolejnym enzymem, odszczepiającym resztę kwasu bursztynowego z produktu wcześniejszej reakcji aminacji, w wyniku czego powstaje LL-2,6-diaminopimelinian, jest desukcynylaza sukcynylo-diaminopimelinianowa [EC 3.5.1.18], której syntezę kodu-

je gen *dapE*. Udowodniono, że ten gen nie jest konieczny do supersyntezy lizyny (11). Ostatnim katalizatorem czteroetapowej drogi syntezy diaminopimelinianu jest epimeraza diaminopimelinianowa [EC 5.1.1.7]. Enzym ten generuje mezo-diaminopimelinian z jego LL-enancjomeru. Reprezentuje on racemazę aminokwasu niezależną od fosforanu pirydoksalu i jest kodowany przez gen *dapF*.

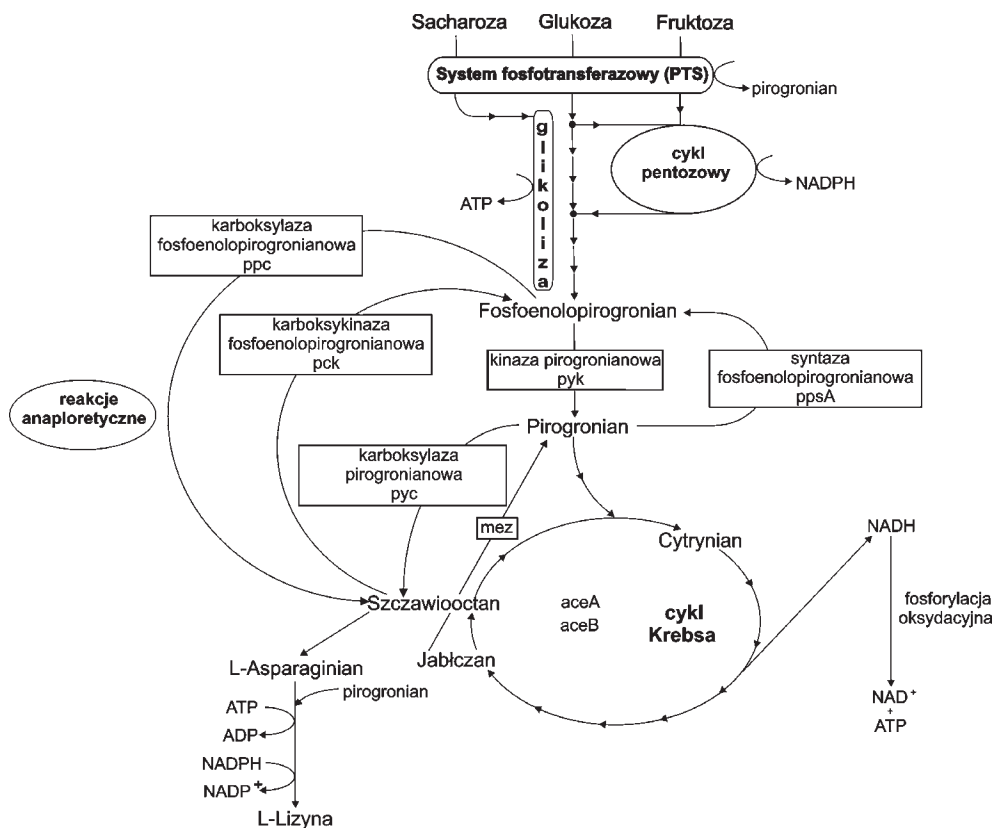
Gen *dapF*, a także gen *dapC*, wcześniej nie rozpoznane, zostały aktualnie zidentyfikowane u *C. glutamicum* (12). Wykazano przy tym, że mutant *dapF*, hodowany w podłożu bogatym w źródło węgla i o limitowanej ilości jonów NH_4^+ , charakteryzował się zredukowanym wzrostem. Podobny fenotyp obserwowali Wehrmann ze wsp. w przypadku mutantów *dapD* lub *dapE* (14). Jest to zrozumiałe, biorąc pod uwagę fakt, że u tych mutantów aktywny był wyłącznie wariant z dehydrogenazą, który jest mało skuteczny, jeśli zewnątrzkomórkowe stężenie NH_4^+ spada poniżej 38 mM. W tych warunkach tworzy się ograniczona ilość diaminopimelinianu, wykorzystywanego z jednej strony do syntezy lizyny, zaś z drugiej do syntezy peptydoglikanu ściany komórkowej (13). Zaskakujące były natomiast wyniki obserwacji mutantu *dapC* (12). Nie wykazywał on redukcji wzrostu, nawet przy równoczesnym uszkodzeniu *ddh*. Wskazuje to na istnienie dodatkowej aminotransferazy, stanowiącej substytut aminotransferazy kodowanej przez gen *dapC* u *C. glutamicum*. Klonowanie i nadekspresja *dapC* lub *dapF* zwiększały produkcję lizyny przez komórki.

Utworzony mezo-diaminopimelinian ulega dekarboksylacji do L-lizyny w obecności dekarboksylazy diaminopimelinianowej [EC 4.1.1.20], kodowanej przez gen *lysA*. Jej koenzymem jest fosforan pirydoksalu (15).

Ostatnim etapem produkcji lizyny jest jej wydzielanie do podłoża. Odbywa się ono na zasadzie wtórnego transportu aktywnego (symport z dwoma jonami OH^- lub antyport z dwoma jonami H^+), w którym siłami napędowymi są protonowy gradient elektrochemiczny i gradient stężenia lizyny (16,17). W wyniku przeprowadzonych molekularnych badań umożliwiono identyfikację przenośnika aminokwasu – LysE (18). Jest on niewielkim białkiem membranowym o masie 25,4 Da. Przenośnik składa się z sześciu hydrofilowych domen (19). Pięć z nich o charakterze α -helis przenika przez wewnętrzną dwuwarstwę lipidową membrany. Dodatkowa, hydrofobowa domena może zanurzać się w błonie komórkowej lub występować na jej powierzchni. Białko LysE jest pierwszym przedstawicielem nowej, stale uzupełnianej rodziny białek transportowych, obecnych u bakterii i *Archaea* (20). Może ono przenosić, oprócz L-lizyny, również L-argininę. Kiedy w komórce zwiększa się stężenie jednego z tych aminokwasów, indukowany jest jego transport do podłoża. Synteza eksportera jest kontrolowana równocześnie przez transkrypcyjny regulator LysG i jeden z aminokwasów zasadowych (21). Przenośnik LysE pełni rolę zaworu zabezpieczającego komórki przed nadmiernym nagromadzeniem się w nich lizyny lub argininy. Reprezentuje on nowy typ kontroli wewnątrzkomórkowego poziomu aminokwasów poprzez ich sekrecję. Nadekspresja *lysEG* w dzikim szczepie *C. glutamicum* zwiększała szybkość sekrecji lizyny do poziomu, przewyższającego obserwowany u szczepów produkujących (18).

4. Uwarunkowania *Corynebacterium glutamicum* do nadprodukcji L-lizyny

Architektura sieci centralnych przemian metabolicznych u *C. glutamicum* zapewnia dopływ dużych ilości szczawiooctanu, pirogronianu, ATP i NADPH, wymaganych do supersyntezy tego aminokwasu (rys. 2). Podstawową rolę w tej syntezie odgrywają enzymy anaplerotyczne. Komórki *C. glutamicum* wyposażone są w unikatowy zestaw tych enzymów. Posiadają one dwa enzymy katalizujące proces syntezy szczawiooctanu: karboksylazę fosfoenolpirogronianową [EC 4.1.1.31] i karboksylazę pirogronianową [EC 6.4.1.1] oraz enzymy prowadzące dekarboksylację związków czterowęglowych do pirogronianu (dehydrogenaza jabłczanowa, EC 1.1.1.40) lub fosfoenolpirogronianu (karboksykinaza fosfoenolpirogronianu, EC 4.1.1.32). Re-



Rys. 2. Metabolizm centralny u *Corynebacterium glutamicum* i jego powiązanie z biosyntezą L-lizyny (22,23,34). *aceA*, *aceB* – geny enzymów cyklu kwasu glioksalowego: liazy izocytrynianowej i syntazy jabłczanowej, *mez* (*malE*) – gen dehydrogenazy jabłczanowej (dekarboksylującej szczawiooctan, NADP⁺).

akcje anaplerotyczne, a także system fosfotransferazowy PTS generują zatem dwa ważne metabolity: szczawiooctan i pirogronian, które stanowią nie tylko substraty do syntezy L-lizyny, ale również bazę do budowy ponad 35% materiału komórkowego (6). Pirogronian dostarcza ponadto acetylo-CoA, który przyczynia się do generowania ATP w procesie oksydacyjnej fosforylacji.

Stwierdzono, że karboksylaza pirogronianowa i karboksykinaza fosfoenolopirogronianowa są najbardziej aktywnymi enzymami, katalizującymi ponad 90% anaplerotycznych reakcji dekarboksylacji i karboksylacji (22). Te dwa enzymy tworzą cykl, w którym pirogronian ulega karboksylacji do szczawiooctanu, który jest dekarboksylowany do fosfoenolopirogronianu, a fosfoenolopirogronian jest przekształcany do pirogronianu przez kinazę pirogronianową, czemu towarzyszy rozkład 1 mola ATP. Interesujący okazał się fakt, że zwiększenie aktywności dekarboksylaz, uczestniczących w reakcjach anaplerotycznych powoduje zmniejszenie wydajności biosyntezy lizyny (23). Sugerowało to, że wyeliminowanie tej aktywności lub zwiększenie aktywności enzymów katalizujących odwrotne reakcje karboksylacji mogłoby zwiększyć produkcję lizyny. Jednakże nadekspresja genu *pyc* kodującego karboksylazę pirogronianową w dzikim szczepie *C. glutamicum* nie przyniosła spodziewanego rezultatu, bowiem pozytywny skutek tego zabiegu, polegający na zwiększonej syntezie szczawiooctanu, był minimalizowany przez system kontroli drogi biosyntezy lizyny. Utworzony w tych warunkach szczawiooctan był kierowany do cyklu TCA, a nie do produkcji aminokwasu. Równoczesna ekspresja genu *pyc* i genu kinazy asparaginianowej zwiększała natomiast 2,5-krotnie zdolność dzikiego szczepu do syntezy lizyny (24). Znaczący wzrost aktywności lizynotwórczej obserwowano również zwiększając ilość kopii karboksylazy pirogronianowej w komórkach produkcyjnego szczepu *C. glutamicum*, który w wyniku mutagenizacji utracił wrażliwość kinazy asparaginianowej na hamujące działanie treoniny z lizyną (25).

Bakterie *C. glutamicum* dysponują prostym, elastycznym systemem kontroli syntezy lizyny. Bakterie te nie posiadają izoenzymów i związanych z tym dodatkowych mechanizmów regulacji (25). Przepływ metabolitów od kwasu asparaginowego do lizyny kontrolowany jest tylko w trzech miejscach: działania kinazy asparaginianowej, dystrybucji β -semialdehydu kwasu asparaginianowego oraz wydzielania aminokwasu z komórek do podłoża. Pozostałe enzymy właściwego szlaku syntezy lizyny nie podlegają kontroli na poziomie genomu, również ich aktywności katalityczne nie są regulowane. Ułatwia to udrożnienie i ukierunkowanie przepływu strumienia związków węglowych na syntezę tego aminokwasu. Równocześnie obecność dwóch szlaków syntezy diaminopimelinianu zaspokaja duży popyt lizynotwórczych szczepów na ten aminokwas.

Bakterie *C. glutamicum* nie wykazują aktywności enzymów degradujących lizynę. Ochronę przed nadmiernym wewnątrzkomórkowym stężeniem aminokwasu zapewnia aktywny białkowy przENOŚNIK. Podlega on pełnej, dwudziestokrotnej indukcji przy wzroście stężenia lizyny w komórkach szczepu produkcyjnego do 40 mM i może transportować aminokwas do podłoża z szybkością $0,75 \text{ nmoli} \times \text{min}^{-1} \times (\text{s.m.})^{-1}$ (26).

5. Szczepy przemysłowe i ich ulepszanie

Dzikie szczepy *C. glutamicum* nie wydzielają lizyny do środowiska. Jest to spowodowane z jednej strony ścisłą kontrolą aktywności kinazy asparaginianowej, z drugiej zaś niskim powinowactwem syntazy dihydrodipikolinianowej do β -semialdehydu kwasu asparaginowego. Uzyskane w tych warunkach wewnątrzkomórkowe stężenie lizyny jest niewystarczające do sekrecji tego aminokwasu. W celu osiągnięcia nadprodukcji lizyny konieczne zatem jest wyeliminowanie mechanizmu kontroli kinazy asparaginianowej oraz zablokowanie szlaków syntezy aminokwasów innych niż lizyna.

W przemysłowym procesie biosyntezy lizyny dominują mutanty auksotroficzne, wymagające do wzrostu homoseryny (lub treoniny i metioniny) bądź dodatkowo leucyny, mutanty regulatorowe, selekcjonowane wśród szczepów opornych na strukturalny analog lizyny – S-(2-aminoetylo)-L-cysteinę, mutanty kombinowane, łączące w sobie obydwa typy mutacji (rys. 1) oraz mutanty transportowe o zwiększonej sekrecji lizyny (27,28).

Klasyczne metody otrzymywania szczepów produkcyjnych *C. glutamicum* mogą być zastępowane lub uzupełniane technikami inżynierii genetycznej, umożliwiającymi bezpośrednie mutacje genu bądź transpozonu w chromosomie. Dostępne są dla tych drobnoustrojów wektory do klonowania, otrzymane w wyniku zespolenia wyizolowanych z nich małych kryptycznych plazmidów z plazmidowymi wektorami *Escherichia coli*, zawierającymi markery selekcyjne, warunkujące oporność na określone antybiotyki (29). Opracowano różne sposoby wprowadzania tych wektorów do komórek, a mianowicie: transformację protoplastów, elektroporację nienaruszonych komórek, a także transfer mobilizowalnych samobójczych plazmidów z *E. coli* do *C. glutamicum* przez transkoniugację, stosowany do uszkodzenia i wymiany genu (12). Opanowano różne techniki klonowania genów: heterologiczną komplementację, homologiczną komplementację i skrining bibliotek genowych przy użyciu sond oligonukleotydowych. Zastosowanie tych technik umożliwiło sklonowanie wszystkich genów kodujących drogę biosyntezy lizyny u *C. glutamicum*, a także genów, odpowiedzialnych za funkcjonowanie metabolizmu centralnego (12,30).

Rekombinacja DNA, a także analiza i kontrola przepływów metabolitów oraz matematyczne modelowanie metabolizmu są ważnymi narzędziami inżynierii metabolicznej. Zintegrowana aplikacja tych narzędzi umożliwiła pogłębienie wiedzy odnośnie do biosyntezy lizyny i zwiększenie zdolności szczepów do wytwarzania tego aminokwasu. Stosując techniki inżynierii genetycznej uzyskano szczepy *C. glutamicum*, charakteryzujące się m.in. nadekspresją genu karboksylazy pirogronianowej (31), mutacją genu kinazy asparaginianowej (32), nadekspresją genów: syntazy dihydrodipikolinianowej (6,33), aminotransferazy sukcylo-pimelinianowej i epimerazy diaminopimelinianowej (12). Szczepy te produkowały lizynę w ilościach większych aniżeli szczepy wyjściowe, zaś niepożądane aminokwasy (izoleucyna i alanina) w ilościach mniejszych, w porównaniu ze szczepem wyjściowym.

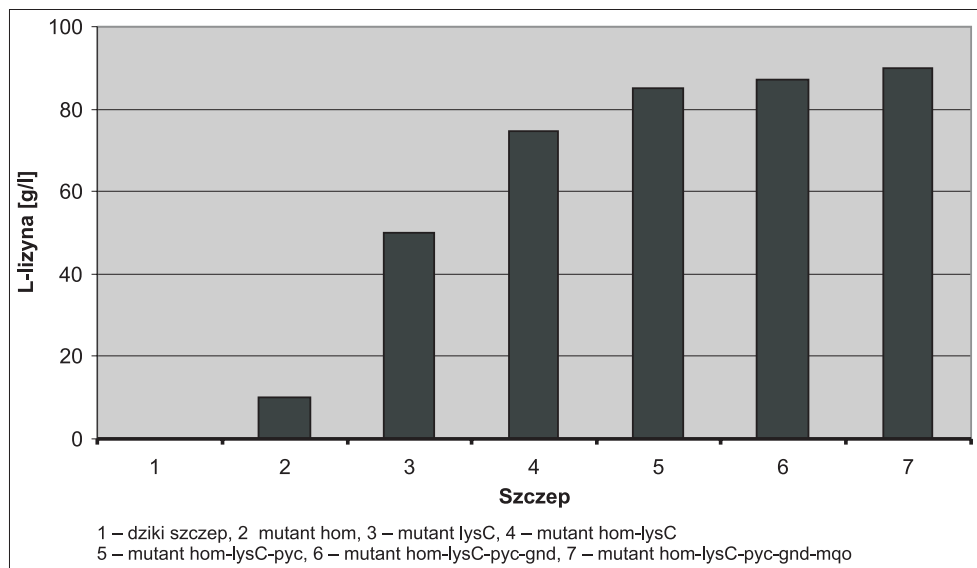
Kompletne sekwencjonowanie genomu przemysłowego producenta kwasu glutaminowego i lizyny *C. glutamicum* ATCC 13032 umożliwiło nie tylko określenie jego struktury, ale także rekonstrukcję dróg biosyntezy i transportu, ważnych dla super-syntezy aminokwasów i witamin pochodzących od kwasu L-asparaginowego i pirogronowego: lizyny, metioniny, treoniny, izoleucyny, waliny i kwasu D-pantotenowego (34).

Ustalono, że genom *C. glutamicum* stanowi pojedynczy kolisty chromosom, złożony z 3 282 708 par zasad. Zidentyfikowano 3002 geny kodujące białka i określono funkcje 2489 enzymów.

Postęp w genomice i proteomice wykorzystano do określenia pełnej sekwencji genomu dzikiej odmiany szczepu *C. glutamicum* ATCC 13032 i opracowania racjonalnej metody rekonstrukcji produkcyjnych szczepów, nazwanej metodą „powielania genomu” (ang. *genome breeding*) (35). Metoda ta bazuje na analizie porównawczej genomu superproducenta lizyny z genomem szczepu dzikiego i wyboru na tej podstawie minimalnego pakietu mutowanych genów, gwarantującego zwiększoną syntezę aminokwasu. Badacze japońscy, stosując metodę „powielania genomu”, ustalili, że punktowe mutacje w kodujących regionach każdego z następujących genów: *hom*, *lysC*, *pyc*, *gnd* i *mgo* pozytywnie wpływały na biosyntezę lizyny przez dziki szczep *C. glutamicum* (36). Dwa pierwsze geny są bezpośrednio związane z przemianą asparaginianu do lizyny (rys. 1), trzy pozostałe z centralnym metabolizmem węgla. Gen *pyc* uczestniczy w reakcjach anaplerotycznych (rys. 2), gen *gnd* dehydrogenazy fosfoglukonianowej [EC 1.1.1.44] w cyklu pentozowym, zaś gen *mgo*, kodujący dehydrogenazę jabłczanową (akceptor: chinon) [EC 1.1.99.16], funkcjonuje w cyklu TCA. Mutacje sekwencyjnie wprowadzano do dzikiego genomu przez allelomorficzne podstawienie. Podstawienie rozpoczynano prowadząc mutacje w relevantnych terminalnych drogach biosyntezy lizyny i kontynuowano je w centralnych szlakach przemian metabolicznych. Jeśli mutacja była pozytywna dla tej biosyntezy, zachowywano ją w genomie, a zmutowany szczep traktowano jako wyjściowy do kolejnego zabiegu.

Mutacja genu *hom* i mutacja genu *lysC* nadawały fenotypowi gospodarza odpowiednio częściowe zapotrzebowanie na L-homoserynę oraz oporność na analog L-lizyny – S-(2-aminoetylo)-L-cysteinę. Połączenie tych mutacji w genomie dzikiego szczepu dodatkowo stymulowało biosyntezę lizyny, co można tłumaczyć zwiększonym stopniem deregulacji kinazy asparaginianowej. Podwójny mutant *hom-lysC* produkował $70 \text{ g} \times \text{dm}^{-3}$ lizyny w procesie fermentacji okresowej z zasilaniem, zaś pojedyncze mutanty *hom* i *lysC* nagromadzały w tych samych warunkach odpowiednio 10 i $50 \text{ g} \times \text{dm}^{-3}$ aminokwasu (rys. 3).

Kolejne trzy mutacje genów: *pyc*, *gnd* i *mgo*, wprowadzane pojedynczo w genom mutantu *hom-lysC*, powodowały stopniowy wzrost ilości nagromadzonej lizyny do poziomu odpowiednio 85, 88 i $90 \text{ g} \times \text{dm}^{-3}$. Pozytywny wpływ dwóch pierwszych mutacji jest oczywisty. Mutacja genu *pyc* karboksylazy pirogronianowej przyspieszała reakcję przemiany pirogronianu do szczawioctanu, a zatem zwiększała dostępność



Rys. 3. Porównanie wydajności biosyntezy L-lizyny przez zdefiniowane mutanty *Corynebacterium glutamicum* (36); *hom*, *lysC*, *pyc*, *gnd*, *mqo* – geny: dehydrogenazy homoserynowej, kinazy asparaginianowej, karboksylazy pirogronianowej, dehydrogenazy fosfoglukonianowej, dehydrogenazy jabłczanowej (akceptor).

tego ostatniego do syntezy lizyny. Mutacja genu *gnd* dehydrogenazy fosfoglukonianowej przyczyniała się do wzrostu o 8% przepływu metabolitów przez szlak pentozofosforanowy, a tym samym zwiększała ilość NADPH, wymaganego do produkcji aminokwasu (rys. 2). Podobne polepszenie ilości syntetyzowanej lizyny obserwowano prowadząc, nonsensowną wydawałoby się, mutację genu *mqo* dehydrogenazy jabłczanowej (akceptor). Dehydrogenaza ta (MQO), podobnie jak dehydrogenaza jabłczanowa zależna od NAD (MDH) katalizuje cykliczną konwersję jabłczanu do szczawiooctanu, jednakże enzym ten, w przeciwieństwie do MDH, wykorzystuje chinony, a nie NAD, jako akceptory elektronów. MQO zapewnia komórkom osiągnięcie wysokiej aktywności cyklu TCA, niezależnie od stosunku NADH/NAD. Przypuszcza się, że mutacja genu *mqo* ogranicza przepływ metabolitów przez cykl TCA i kieruje część szczawiooctanu do syntezy lizyny w celu zachowania równowagi redox.

Na podstawie porównawczej analizy transkryptomu klasycznego mutantu z jego dziką odmianą wskazano, że globalna indukcja genów, uczestniczących w biosyntezie aminokwasów może polepszać produkcję lizyny w wyniku zwiększenia ekspresji operonu *lysC-*asd** (35). Zwiększenie to osiągnięto, wprowadzając mutację genu *leuC* dehydratazy 3-izopropyljabłczanowej do zdefiniowanego mutantu *hom-lysC*, syntetyzującego $73 \text{ g} \times \text{dm}^{-3}$ lizyny (rys. 3). Otrzymany mutant wymagał do wzrostu leucyny i produkował $83 \text{ g} \times \text{dm}^{-3}$ aminokwasu (37). Korzystny wpływ cechy, jaką jest auksotrofia względem leucyny, na biosyntezę lizyny nie jest zaskoczeniem, wiadomo-

mo bowiem od dawna, że cecha ta zwiększa produktywność klasycznych szczepów przemysłowych (27).

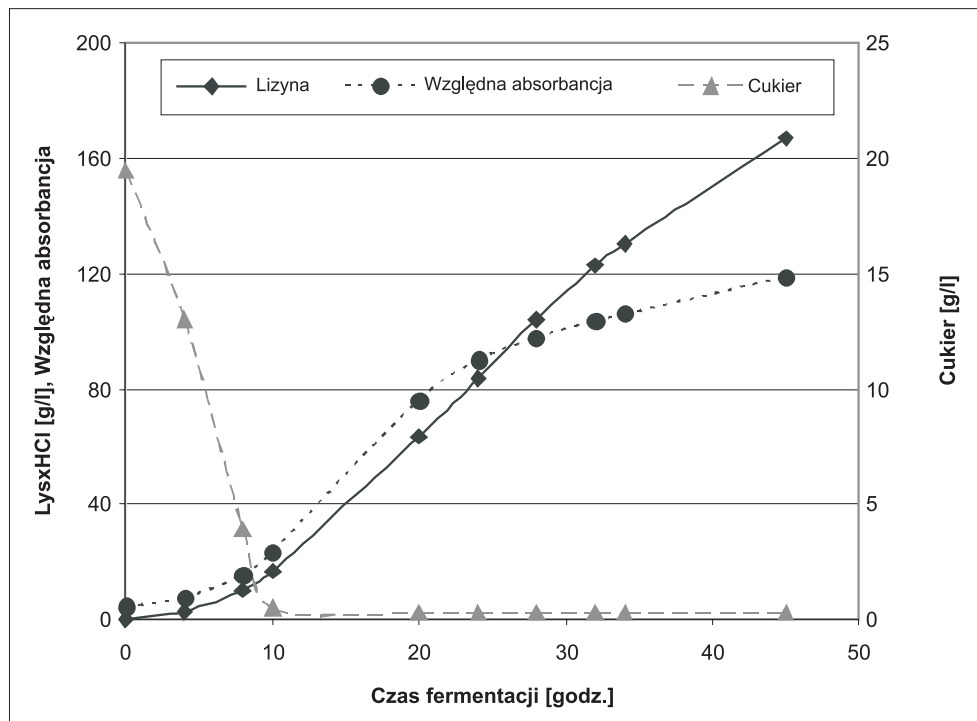
Rekonstruowane szczepy nie osiągały wydajności lizyny na poziomie tak wysokim jaki odnotowano dla przemysłowego producenta aminokwasu *C. glutamicum* B-6 (>100 g/l), otrzymanego w wyniku klasycznej mutagenizacji dzikiego szczepu *C. glutamicum* ATCC 13032. Należy jednak podkreślić, że klasycznie otrzymywane mutanty mogą syntetyzować 0,43-0,54 moli lizyny z jednego mola glukozy (38). Osiągnięcie tak wysokiej produktywności technikami rekombinacji DNA jest niezwykle trudne. Techniki te można natomiast wykorzystać do polepszenia szczepów przemysłowych.

6. Technologia produkcji L-lizyny

Procesy biosyntezy lizyny prowadzone są w bioreaktorach o pojemności 50-500 m³. Inokulum namażane jest w 1-10 etapach. Źródłami węgla w podłożach produkcyjnych są najczęściej: melasa z trzciny cukrowej (Ameryka Południowa, Chiny), melasa buraczana (Europa) lub hydrolizaty skrobi (Ameryka Północna, Azja), rzadziej sacharoza (12). Amoniak lub sole amonowe pełnią rolę źródeł azotu i czynników regulujących pH środowiska hodowlanego. Wykorzystanie jonów amonowych można zredukować, regulując ciśnienie CO₂ w układzie hodowlanym, jony węglanowe lub wodorowęglanowe stanowią bowiem przeciwjony dla syntetyzowanej lizyny. Aminokwasy wymagane do wzrostu szczepu są wprowadzane z hydrolizatami białek roślinnych, ekstraktem drożdżowym bądź wyciągiem namokowym kukurydzy. Ten ostatni stanowi bogate źródło zarówno aminokwasów, jak i oligopeptydów, witamin, nukleotydów oraz nieorganicznych i organicznych fosforanów. Hydrolizaty białek zwierzęcych nie są aktualnie stosowane ze względu na niebezpieczeństwo występowania gąbczastej encefalopatii bydła (BSE, ang. *bovine spongiform encephalopathy*). Ważnymi składnikami podłoży są makroelementy (fosforany sodu lub potasu, jony Mg⁺²) i mikroelementy (Mn⁺², Fe⁺² i inne).

Istotny wpływ na biosyntezę lizyny ma stężenie tlenu rozpuszczonego w podłożu. Jest to zrozumiałe, zważywszy fakt, że wydajność tego procesu zależy od funkcjonowania cyklu TCA i przebiegu reakcji anaplerotycznych. Zapotrzebowanie szczepu produkcyjnego na tlen jest różnicowane. Wymaga to optymalizacji natleniania zarówno na etapie wzrostu komórek, jak i na etapie właściwej biosyntezy (39). Niedobór tlenu sprzyja powstawaniu kwasu mlekowego i alaniny zamiast lizyny, zaś nadmiar zwiększa produkcję biomasy i przyczynia się do tworzenia niepożądanych, częściowo utlenionych produktów ubocznych (np. kwasu 2-oksoglutarowego). Stąd ważnym kryterium przy zwiększaniu skali procesu jest stosunek ilości wykorzystywanego tlenu do ilości utylizowanego cukru.

Automatyzacja procesów technologicznych oraz zastosowanie optymalnych strategii prowadzenia i kontroli biosyntezy lizyny przyczyniły się do polepszenia wydaj-



Rys. 4. Charakterystyka przebiegu procesu fermentacji L-lizyny (Degussa, Niemcy) (3).

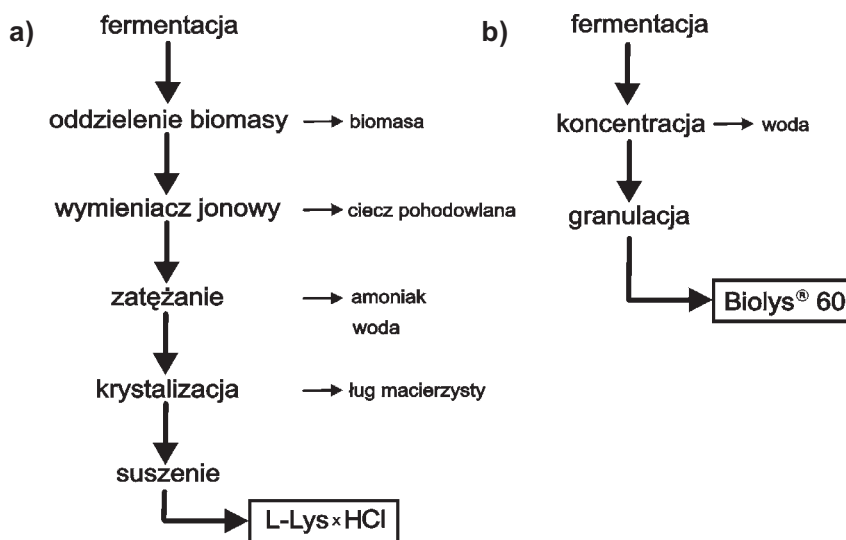
ności tego aminokwasu. Opisano uproszczone kinetyczne modele, uwzględniające reakcje enzymatyczne, zachodzące w procesie syntezy lizyny przez *C. glutamicum* (40,41). Bieżąca (w trybie *on-line*) analiza przebiegu tych reakcji została wykorzystana do polepszenia kontroli i optymalizacji warunków tworzenia i sekrecji lizyny.

Dominującą metodą produkcji lizyny jest fermentacja okresowa z zasilaniem (ang. *fed batch fermentation*), prowadzona w temperaturze 30-34°C, w ciągu 48-60 godzin (rys. 4). Pożywka zasilająca, oprócz sacharydów, zawiera zazwyczaj siarczan amonu, który neutralizuje tworzący się aminokwas. Lizyna w tym przypadku występuje w podłożu w postaci siarczanu. Pożywka jest dozowana w sposób ciągły, po wyczerpaniu się sacharydów, wprowadzonych do podłoża na początku procesu fermentacji. Hodowla okresowa z zasilaniem wymaga ścisłej kontroli dozowania pożywki. Umożliwia to uniknięcie nadmiernych stężeń składników pożywki w podłożu hodowlanym, powodujących hamowanie procesu biosyntezy lizyny i syntezę produktów ubocznych (mleczanu, octanu, pirogronianu, alaniny), a także skrócenie lag-fazy i ograniczenie wzrostu komórek (42,43). Pomyślnie zakończyły się próby zastosowania do otrzymywania lizyny metody fermentacji z powtórным zasilaniem (ang. *repeated fed batch fermentation*). Produktywność aminokwasu wzrosła o 15%.

Ciągłe procesy biosyntezy lizyny przez *C. glutamicum* mają już swoją tradycję. Proces taki, opisany przez Hirao i wsp. w 1989 r. (44), był stabilny przez ponad 300 godzin, a produktywność aminokwasu zwiększyła się trzykrotnie w porównaniu z klasyczną hodowlą okresową. W procesach ciągłych stosowane są generalnie dwie metody hodowli. Pierwsza z nich to hodowla w turbidystacie, zapewniająca stały poziom stężenia biomasy, druga – to hodowla w chemostacie, umożliwiająca zachowanie stałych stężeń wybranych składników pożywki, np. źródła węgla i jonów fosforanowych (43). Ciągłe procesy biosyntezy lizyny gwarantują większe aktywności szczepów w porównaniu z uzyskiwanymi w warunkach hodowli okresowej, jednak nie znalazły one, jak dotąd, zastosowania w przemyśle ze względu na wysokie ryzyko zakażenia środowiska hodowlanego.

Przemysłowe szczepy *C. glutamicum* mogą syntetyzować 0,43-0,54 mola lizyny z jednego mola glukozy (40). Ich produktywność kształtuje się na poziomie 3,6-8,5 mola lizyny \times m⁻³ \times h⁻¹. Wydajność syntezy aminokwasu w procesach okresowych z ciągłym zasilaniem pożywką przekracza zazwyczaj 100 g \times dm⁻¹ i może dochodzić do 150, a nawet 170 g \times dm⁻¹ (45).

Lizynę, nagromadzoną w podłożu produkcyjnym wyodrębnia się różnymi metodami (rys. 5). Pierwszy sposób polega na izolowaniu lizyny metodą chromatografii jonowymiennej, zateżnieniu i krystalizacji (46). Uzyskany tą metodą krystaliczny preparat zawiera 98,5% monochlorowodoru L-lizyny. Drugi sposób obejmuje oddzielenie biomasy i zateżnienie klarownego płynu pohodowlanego, a w jego wyniku powstaje alkaliczny koncentrat, zawierający 50% L-lizyny (45). Trzecia procedura jest



5. Schematy otrzymywania krystalicznych (a) i paszowych (b) preparatów L-lizyny (Degussa, Niemcy) (13).

najbardziej efektywna, ponieważ pozwala zminimalizować straty aminokwasu oraz ilość ścieków. Wykorzystuje ona bezpośrednie suszenie rozpryskowe całego podłoża fermentacyjnego, po którym następuje granulacja. Otrzymany granulata zawiera około 50% siarczanu L-lizyny (47).

7. Podsumowanie

We współczesnej praktyce przemysłowej metodą syntezy mikrobiologicznej otrzymuje się około 70% sumarycznej puli wytwarzanych aminokwasów i ponad 90% L-lizyny. Ogromne zainteresowanie tym sposobem produkcji wynika przede wszystkim z jego wysokiego wskaźnika ekonomicznego, a także z możliwości uzyskania w obrębie jednego przedsiębiorstwa końcowego produktu w postaci preparatów paszowych bądź preparatów krystalicznych o wysokim stopniu czystości. Wydajność końcowa procesu mikrobiologicznego jest wypadkową zdolności szczepu produkcyjnego do supersyntezy aminokwasu oraz zastosowanych warunków fermentacji i izolowania produktu.

Wśród drobnoustrojów produkujących L-aminokwasy szczególną pozycję zajmują szczepy *C. glutamicum*, stosowane w przemysłowych syntezach kwasu glutaminowego, lizyny, waliny, izoleucyny, treoniny, kwasu asparaginowego, alaniny i innych. Obszerne badania w zakresie biochemii, fizjologii i biologii molekularnej dostarczyły wielu nowych, cennych informacji o właściwościach tych szczepów. Opracowano dla tych bakterii różne techniki klonowania, transformacji oraz sposoby bezpośrednich mutacji chromosomalnych. Ustalono strategię kompletnego sekwencjonowania i strukturę genomu *C. glutamicum*. Stwierdzono obecność u tych bakterii genów kodujących wszystkie enzymy uczestniczące w glikolizie, cyklu pentozofosforanowym, cyklu TCA, genów cyklu kwasu glioksylogowego i innych enzymów anaplerotycznych oraz glukoneogenezy. Znajomość kompletnej sekwencji genomu umożliwiła rekonstrukcję przepływów metabolitów do lizyny i innych ważnych związków (L-waliny i D-pantotenianu) pochodzących od asparaginianu i pirogronianu, zwłaszcza w obszarze odwracalnych reakcji anaplerotycznych, pełniących podstawową rolę w biosyntezie tych związków. Wykazano, że transport lizyny z podłoża do komórek zachodzi przy udziale białkowego „wymienika” lizyna/alanina, kodowanego przez gen *lysI* (34). Całkowita aktywność tego systemu transportu jest bardzo mała (około $0,15 \text{ nmoli} \times \text{min}^{-1} \times (\text{mg s.m.})^{-1}$) i dlatego nie ma wpływu na produkcję aminokwasu. Ustalono, że białko eksportujące lizynę z komórek do podłoża jest syntetyzowane przy udziale genu *lysE*, zaś synteza tego genu jest kontrolowana przez transkrypcyjny autoregulator LysG, należący do grupy LysR. Udowodniono przy tym ważną funkcję systemów transportu lizyny jako regulatorów biosyntezy tego aminokwasu. Zdobyta wiedza umożliwiła sterowanie przepływami metabolitów, konstruowanie szczepów o żądanym genotypie oraz opracowanie nowych strategii optymalizacji warunków i kontroli procesów, prowadzonych przy udziale

drobnoustrojów, intensyfikuje rozwój metod analitycznych bazujących na genomice i proteomice. Ma ona charakter uniwersalny i może być wykorzystana do polepszenia produktywności zarówno *C. glutamicum*, jak i innych bakterii.

Literatura

1. Leuchtenberger W., Huthmacher K., Drauz K., (2005), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 69, 1-8.
2. Leuchtenberger W., (1996), in: *Biotechnology*, Eds. Rehm H. J., Reed G., 6, 455-502, VCH, Weinheim.
3. Kirchen M., Pfefferle W., (2001), *The Chemosphere*, 43, 27-31.
4. Liebl W., Ehrmann M., Ludwig W., Schleifer K. H., (1991), *Jnt. J. Syst. Bacteriol.*, 41, 255-260.
5. Kinoshita S., (1985), in: *Biology of industrial microorganisms*, Eds. Demain A. L., Solomon N. A., 263-324, Benjamin/Cummings, London.
6. de Graaf A. A., Eggeling L., Sahm H., (2001), *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 73, 9-29.
7. Follettie M. T., Peoples O. P., Ageropoulou C., Sinskey A. J., (1993), *J. Bacteriol.*, 175, 4096-4103.
8. Cremer J., Eggeling L., Sahm H., (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1746-1752.
9. Jetten M. S. W., Follettie M. T., Sinskey A. J., (1995), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43, 76-82.
10. Patek M., Bilic M., Krumbach K., Eikmanns B., Sahm H., Eggeling L., (1997), *Biotechnol. Lett.*, 19, 1113-1117.
11. Shaw-Reid C. A., McCormick M. M., Sinskey A. J., Stephanopoulos G., (1999), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51, 325-333.
12. Hartmann M., Tauch A., Eggeling L., Bathe B., Möckel B., Pühler A., Kalinowski J., (2003), *J. Biotechnol.*, 104, 199-211.
13. Sonntag K., Eggeling L., de Graaf A. A., Sahm H., (1993), *Eur. J. Biochem.*, 213, 1325-1331.
14. Wehrmann A., Phillips B., Sahm H., Eggeling L., (1998), *J. Bacteriol.*, 180, 3159-3165.
15. Jetten M. S. M., Sinskey A. J., (1995), *Crit. Rev. Biotechnol.*, 15, 73-103.
16. Bröer S., Krämer R., (1991), *Eur. J. Biochem.*, 202, 131-135.
17. Bröer S., Krämer R., (1991), *Eur. J. Biochem.*, 202, 137-143.
18. Vrljić M., Sahm H., Eggeling L., (1996), *J. Mol. Microbiol.*, 22, 815-826.
19. Vrljić M., Garg J., Bellmann A., Wach S., Freudl R., Malecki M. J., Sahm H., Kozina V. J., Eggeling L., Saier M. H Jr., (1999), *J. Mol. Microbiol.*, 1, 327-336.
20. Aleshin V. V., Zakataeva N. P., Livshits V., (1999), *Trends Biochem. Sci.*, 24, 133-135.
21. Marx A., Striegel K., de Graaf A. A., Sahm H., (1999), *Biotechnol. Bioeng.*, 56, 168-180.
22. Petersen S., de Graaf A. A., Eggeling L., Möllney M., Wiechert W., Sahm H., (2000), *J. Biol. Chem.*, 275, 35932-35941.
23. Marx A., de Graaf A. A., Wiechert W., Eggeling L., Sahm H., (1996), *Biotechnol. Bioeng.*, 49, 111-129.
24. Koffas M. A. G., Jung G. Y., Stephanopoulos G., (2003), *Metabolic Engineering*, 5, 32-41.
25. Sahm H., Eggeling L., de Graaf A. A., (2000), *Fourteenth Forum for Applied Biotechnology*, 221-229, GOM West-Vlaanderen, Gent.
26. Bellmann A., Vrljić M., Patek M., Sahm H., Krämer R., Eggeling L., (2001), *Microbiology*, 147, 1765-1774.
27. Tosaka O., Takinami K., Hirose Y., (1978), *Agric. Biol. Chem.*, 42, 1181-1186.
28. Schrupf B., Eggeling L., Sahm H., (1992), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 566-571.
29. Nampoothiri M., Pandey A., (1998), *Proces Biochem.*, 33, 147-161.
30. Sahm H., Eggeling L., de Graaf A. A., (2000), *Biol. Chem.*, 381, 899-910.
31. Peters-Wendisch P. G., Schiel B., Wendisch V. F., Katsoulidis E., Möckel B., Sahm H., Eikmanns B. J., (2001), *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 3, 295-300.
32. Onishi J., Mitsuhashi S., Hayashi M., Ando S., Yokoi H., Ochiai K., Ikeda M., (2002), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58, 217-223.
33. Eggeling L., Oberle S., Sam H., (1998), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49, 24-30.

34. Kalinowski J., Bathe B., Bartels D., Bischoff N., Bott M., Burkovski A., Dusch N., Eggeling L., Eikmanns B. J., Gaigalat L., Goesmann A., Hartmann M., Huthmacher K., Krämer R., Linke B., McHardy A. C., Meyer F., Möckel B., Pfeufferle W., Pühler A., Rey D. A., Rückert Ch., Rupp O., Sahn H., Wendisch V. F., Wiegräbe J., Tauch A., (2003), *J. Biotechnol.*, 104, 5-25.
35. Hayashi M., Ohnishi J., Mitsuhashi S., Yonetani Y., Hashimoto S., Ikeda M., (2006), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 546-550.
36. Ikeda M., Ohnishi J., Hayashi M., Mitsuhashi S., (2006), *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 610-615.
37. Hayashi M., Mizoguchi H., Ohnishi J., Mitsuhashi S., Yonetani Y., Hashimoto S., Ikeda M., (2006), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72, 783-789.
38. Weuster-Botz D., Kelle R., Frantzen M., Wandrey C., (1997), *Biotechnol. Prog.*, 13, 387-393.
39. Yao H. M., Tian Y. C., Tade M. O., Ang H. M., (2001), *Chem. Eng. Proc.*, 40, 401-409.
40. Takiguchi N., Shimizu H., Shioya S., (1997), *Biotechnol. Bioeng.*, 55, 170-181.
41. Yang Ch., Hua Q., Shimizu H., (1999), *J. Biosci. Bioeng.*, 88, 393-403.
42. Sassi A. H., Fauvart L., Deschamps A. M., Lebeault J. M., (1998), *Biochem. Eng. J.*, 1, 85-90.
43. Hermann T., (2003), *J. Biotechnol.*, 104, 155-172.
44. Hirao T., Nakao T., Azuma T., Sugimoto M., Nakanishi T., (1989), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 269-273.
45. Eggeling L., Sam H., (1999), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52, 146-153.
46. van Walsen H. J., Thompson M. C., (1997), *J. Biotechnol.*, 59, 127-132.
47. Höffler A., Alt H. C., Klasen C. J., Friedrich H., Hertz U., Mörl L., Schütte R., (1997), Process for the preparation of an animal feed supplement based on fermentation broth, EPO 809 940.