

*Brevibacterium lactofermentum*에서 *ddh* 유전자의 증폭에 의한 L-Lysine의 생산

김옥미 · 박선희 · 이승언 · 배준태 · 김현정 · 이별나¹ · 이갑랑*

영남대학교 식품영양학과, ¹대구공업대학 식품영양학과

L-Lysine Production by Amplification of the *ddh* Gene in a Lysine-producing *Brevibacterium lactofermentum*. Kim, Ok-Mi, Sun-Hee Park, Sung-On Lee, Jun-Tae Bae, Hyun-Jung Kim, Byul-La Lee¹, and Kap-Rang Lee*. Department of Food and Nutrition, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea, ¹Department of Food and Nutrition, Taegu Technical College, Taegu 704-350, Korea - The *ddh* gene encoding meso-DAP-dehydrogenase (DDH) involved in the dehydrogenase pathway is essential for high-level lysine production in *Brevibacterium lactofermentum*. To investigate the effect of the *ddh* gene amplification on lysine production by *B. lactofermentum*, we constructed two *E. coli* - *B. lactofermentum* shuttle vector, pEB1 and pEB2. The recombinant plasmids, pRK1 and pRK2, carrying the *ddh* gene were introduced into *B. lactofermentum* by electroporation. The specific activity of DDH by amplification of the *ddh* gene was increased 7-fold, and also L-lysine production of *B. lactofermentum* strains harboring recombinant plasmids were 18~20% higher than that of the control.

Key words: *Brevibacterium lactofermentum*, shuttle vector, *ddh* gene, amplification, L-lysine

Brevibacterium lactofermentum, *Corynebacterium glutamicum*, 그리고 *Brevibacterium flavum*은 산업적으로 lysine과 같은 아미노산 발효산업에 널리 이용되고 있다 [7]. 이러한 균주의 아미노산 생산성 증대를 위하여 고전적인 mutagenesis와 genetic engineering 등 다양한 기술이 이용되고 있으며 [6], 이들 mutant에 의한 lysine 생산량은 연간 250,000 tons 이상에 달하고 있다 [8].

원핵생물계에서의 L-lysine은 3가지 서로 다른 경로를 통하여 합성되며 대부분의 미생물들은 그 중 한가지 경로를 이용하여 lysine을 생합성하는 것으로 알려져 있다 [21]. 그러나 이러한 생합성 경로에 대한 명칭은 다양하고 일관성이 없으며, 최근에는 acetyl화 된 중간 대사물 [23] 및 succinyl화 된 중간 대사물 [2, 11]을 각각 거쳐 lysine을 생합성하는 2가지 다른 diaminopimelate (DAP) 경로 [22]를 acetylase 경로 및 succinylase 경로로 구별하고 있으며 [20], meso-DAP-dehydrogenase (DDH) 경로 [25]는 dehydrogenase 경로로 불리어지고 있다 [20].

일반적으로 *Escherichia coli*를 비롯한 모든 Gram(-) 균주 및 대부분의 Gram(+) 미생물들은 succinylase 경로로 lysine을 생합성하며 [13], dehydrogenase 경로를 통하여 lysine을 생합성하는 대표적인 균주는 *Bacillus sphaericus*이다 [24]. 그러나 lysine 생산 균주인 *C. glutamicum* 및 *B. lactofermentum*에서는 두가지 경로, 즉 succinylase 경로와 dehydrogenase 경로가 함께 작용하

여 lysine을 생합성하며 산업적으로 lysine 발효산업에 널리 이용되고 있다 [5, 13, 16]. 그러므로 lysine 생산균주에 부가적으로 존재하는 dehydrogenase 경로는 높은 수율의 lysine을 생성하는데 기여할 것으로 사료되며, 또한 중간 물질인 tetrahydrodipicolinate (THDPA)로부터 meso-DAP로의 전환에 있어 acetylase 경로 및 succinylase 경로의 4단계 효소반응을 한단계로 진행시키기 때문에 많은 장점이 있을 것으로 추정된다 (Fig. 1).

본 연구자 등은 *B. lactofermentum*의 lysine 생합성 경로에 있어서 dehydrogenase 경로에 많은 관심을 가지고 다년간 연구를 하면서 *B. lactofermentum*에서 dehydrogenase 경로의 존재를 처음으로 규명하였으며 [16], 또한 dehydrogenase 경로에 관여하는 *ddh* 유전자를 cloning하고 그의 sequence를 보고한 바 있다 [9]. 아울러 최근에는 본 연구자 등이 *B. lactofermentum*의 *ddh* 유전자를 disruption하여 dehydrogenase 경로를 차단시킨 결과, *B. lactofermentum ddh* mutant의 성장 및 lysine 생산량에 있어 극적인 감소를 초래하므로 *B. lactofermentum*에서의 dehydrogenase 경로는 meso-DAP 및 lysine 생합성에 있어 필수불가결한 경로로 작용한다는 것을 확인하였다 [10].

따라서 본 연구에서는 lysine 발효산업에 이용되고 있는 *B. lactofermentum*의 lysine 생산성을 증대시키기 위한 일환으로, *E. coli*-*B. lactofermentum* shuttle vector를 제조하고 이를 이용하여 *B. lactofermentum*의 lysine 생합성에 있어서 필수적으로 작용하는 dehydrogenase 경로에 관여하는 *ddh* 유전자를 증폭시킴으로써 *B. lactofermentum*의 lysine 생성량에 미치는 영향을 조사하였다.

*Corresponding author
Tel. 82-53-810-2871, Fax. 82-53-813-3813
E-mail: Krlee@ynucc.yeungnam.ac.kr

Table 1. Bacterial strains and plasmids used

Strain/plasmid	Genotype	Source or reference
<i>B. lactofermentum</i>		
KCTC1846	AEC ^r Nx ^r ser	KCTC, 19
<i>E. coli</i>		
JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thiΔ(lac-proAB)F. [traD36 proA⁺ proB⁺ lacI^q lacZΔM15]</i>	Promega
plasmid		
pBL1	<i>B. lactofermentum</i> cryptic plasmid	18
pHSG299	Km ^r	Takara
pJUB01	AP ^r Cm ^r	1
pXX14	Ap ^r <i>ddh</i> ⁺	9, 16
pEB1	Km ^r	This work
pEB2	AP ^r Cm ^r	This work
pRK1	Km ^r <i>ddh</i> ⁺	This work
pRK2	AP ^r Cm ^r <i>ddh</i> ⁺	This work

Abbreviations : AEC, S-2-aminoethyl-L-cysteine; Nx, nalidixic acid; Km, kanamycin; Ap, ampicillin; Cm, chloramphenicol; KCTC, Korean Collection for Type Cultures.

재료 및 방법

사용균주 및 plasmids

Brevibacterium lactofermentum KCTC1846(ATCC 21798)[19]은 S-2-aminoethyl-L-cysteine(AEC) 내성 변이주로서 cryptic plasmid pBL1[18]의 제공원으로 사용하였고, *E. coli* JM109는 plasmid DNA를 안정하게 보관시키는 균주로 사용하였다.

Plasmid pXX14는 이전의 논문[9, 16]에서 보고한 대로 *ddh* 유전자를 함유한 재조합 plasmid로 사용하였으며, pHSG299 및 Dr J. Timko로부터 분양받은 pJUB01 [1]은 *E. coli*-*B. lactofermentum* shuttle vector 제조를 위한 *E. coli* replicon으로 사용하였다. 본 실험에 사용한 균주 및 plasmids의 특성은 Table 1과 같다.

배지 및 배양 조건

실험에 사용한 모든 균주 배양에는 LB(Luria-Bertani) 배지[17]를 사용하였으며, 필요에 따라 ampicillin(Ap), kanamycin(Km), chloramphenicol(Cm) 그리고 nalidixic acid(Nx)를 첨가하여 배양하였다. Lysine 정량을 위한 배지[21]로는 완전 배지로서 CGIII배지를 사용하였으며, 최소배지로서 CGC배지를 modification하여 사용하였다. 본 실험에 사용한 *B. lactofermentum* 및 *E. coli*는 호기적 조건하에서 각각 30°C와 37°C에서 배양하였다.

DNA 조작 및 형질전환

*B. lactofermentum*의 cryptic plasmid는 Santamaria 등[18]의 방법으로, *E. coli*로부터 plasmid DNA는 Birnboim and Doly[3]의 alkaline lysis 방법에 따라 추출되었다. 제한효소 절단 및 ligation 반응은 Sambrook 등[17]의 방법에 준하여 수행하였으며 DNA 단편은 투석막을 이용하여 agarose gel 상에서 분리되었다.

*E. coli*의 형질전환은 Sambrook 등[17]의 방법에 따라 수행하였으며, *B. lactofermentum*의 형질전환은 Bonnasie 등[4]의 방법에 준하여 2500 voltage에서 electroporation시켰다.

meso-DAP-dehydrogenase(DDH) 활성측정

DDH 활성측정은 Yeh 등[25]이 사용한 방법에 따라 배양된 균체를 0.2 M glycine-KCl-KOH buffer(pH 10.5)에 현탁하여 세포를 파괴한 후 원심분리하여 상층액을 crude extract로 사용하였다. 효소활성은 기질로 10 mM diaminopimelic acid를 사용하였고 조효소로서 0.1 mM NADP⁺가 포함된 0.2 M glycine-KCl-KOH buffer에 crude extract를 첨가하여 마지막 부피를 1 ml로 맞춘 다음, 37°C에서 30분간 반응시켜 340 nm에서 환원된 NADPH의 양을 측정하였다. 1 unit는 1분당 1 μmole NADPH의 형성을 촉매하는 효소의 양으로 정의하였으며, 비활성은 단백질 mg당 units로 표시하였다. 단백질 정량은 Lowry 등[12]의 방법에 따라 750 nm에서 흡광도로 측정하였으며 bovine serum albumin(0.3 mg/ml)을 standard로 사용하였다.

L-Lysine 및 glucose 정량

Schrumpf 등[21]의 방법에 따라 항생제가 첨가된 CGIII배지에서 배양시킨 균체를 원심분리하여 모우고 0.9% NaCl로 2회 세척한 다음, 각 sample의 OD₆₀₀ 값을 동일하게 하여 modification된 CGC배지로 재접종하여 96시간 동안 배양하였다. 세포성장(OD₆₀₀), glucose 소비량 및 lysine 생성량의 분석을 위하여 3시간 마다 sample 2 ml씩을 취하였으며, 배양동안 10N NH₄OH를 첨가하여 pH 7.4를 유지하였다. Lysine 정량은 배양액을 원심분리하여 얻은 상층액을 0.45 μm membrane filter로 filtration한 후 HPLC(Waters)로 분석하였으며 3회 이상 반복실험하여 평균값으로 나타내었다. 또한 glucose 정량은 glucose oxidase를 사용하여 Sigma사에서 추천한 지시에 준하여 분석하였다.

결과 및 고찰

E. coli-*B. lactofermentum* shuttle vector 제조 및 *B. lactofermentum*의 형질전환

*B. lactofermentum*으로부터 4.4 kb cryptic plasmid

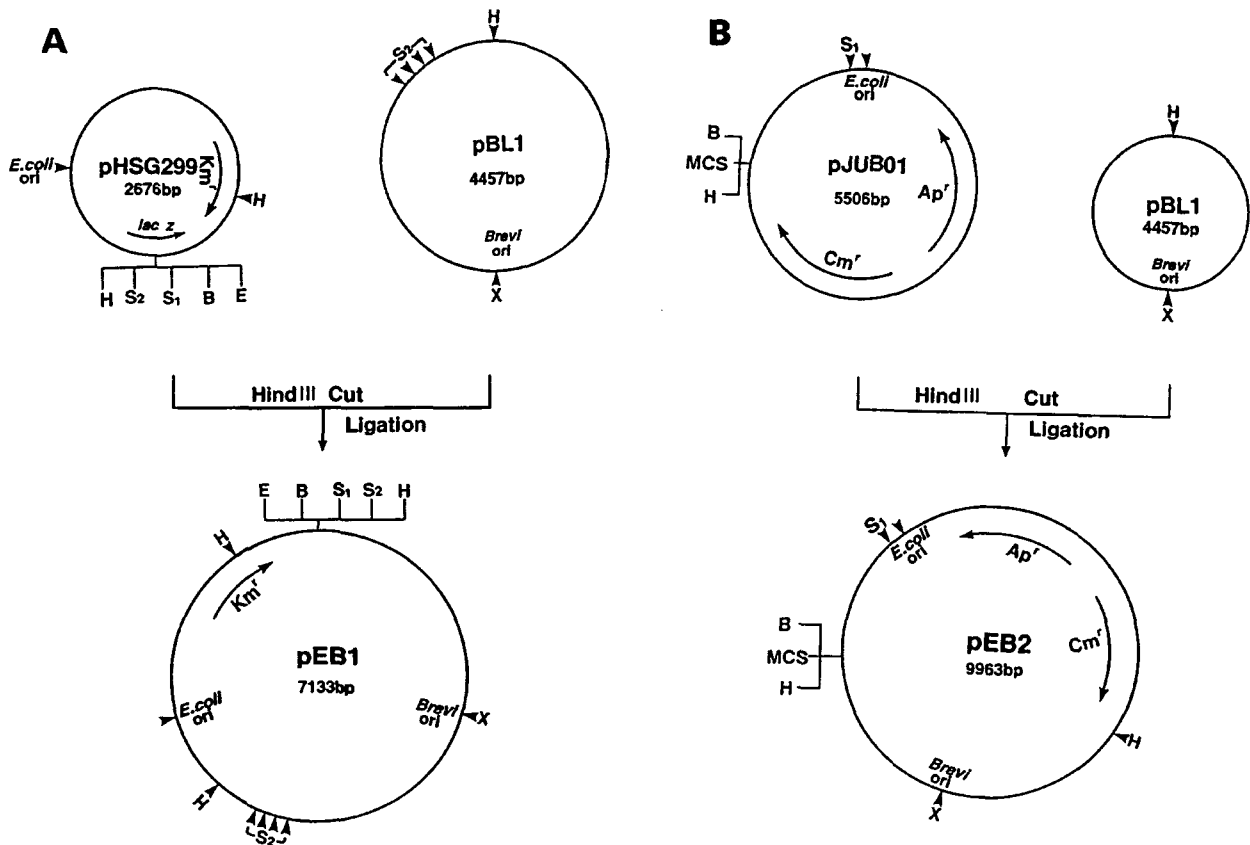


Fig. 1. Construction of shuttle vector pEB1(A) and pEB2(B). Plasmid pBL1 was digested with *Hind*III and ligated with pHS299 partially digested with *Hind*III, yielding pEB1. Plasmid pBL1 and pJUB01 were digested with *Hind*III and ligated, yielding pEB2. B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; S₁, *Sal*I; S₂, *Sph*I; X, *Xba*I.

pBL1[18]을 분리하여 *Hind*III로 절단하고 동일한 효소로 부분절단된 2.7 kb의 pHS299와 ligation시켜 7.1 kb의 pEB1을 제조하였으며(Fig. 1A), 또한 *Hind*III로 처리한 cryptic plasmid pBL1과 동일한 제한효소를 처리한 5.5 kb의 pJUB01[1]과 ligation시켜 대략 10 kb크기의 pEB2을 제조하였다(Fig. 1B). Shuttle vector 제조에 사용된 pHS299 및 pJUB01은 *E. coli* replicon과 multicloning site 등을 가지고 있으며 high-copy plasmid이다. 특히 pJUB01은 promoter가 없는 neomycin 저항 유전자를 함유하고 있어 promoter probe vector로 이용될 수 있는 장점이 있으며 본 연구자 등은 shuttle vector 제조 이외에도 *ddh* 유전자의 promoter 활성 측정을 위하여 이를 사용하였다(data not shown). 각각의 ligation mixture에 의하여 *E. coli* JM109를 형질전환하였고, 형질전환체는 Km 혹은 Ap를 함유한 LB 배지에서 선발되었다. 형질전환체로부터 분리된 plasmid DNA는 *Hind*III로 절단시켜 agarose gel에서 전기영동시킨 결과 pEB1 및 pEB2가 제조되었음을 확인할 수 있었다.

Shuttle vector pEB1 및 pEB2에 의한 *B. lactofermentum*의 형질전환은 electroporation에 의해 이루어졌

으며, pEB1에 의한 형질전환체는 Km을 함유한 배지에서 colony를 형성하였고 pEB2에 의한 것은 Cm을 함유한 배지에서 발현하였지만 Ap를 함유한 배지상에서는 발현하지 못하였다. 이것은 *E. coli*의 Ap^r gene이 *B. lactofermentum*에서 발현하지 못한다는 Ozaki 등[14]의 보고와 일치하였다. Shuttle vector에 의한 *B. lactofermentum*의 형질전환율은 Table 2에서 보는 바와 같이 pEB1에 의한 효율이 pEB2에 의한 것보다 우수하였다. 제조된 pEB1 및 pEB2의 *B. lactofermentum*의 replicon은 모두 4.4 kb cryptic plasmid pBL1로부터 유래하였지만 형질전환율에서 차이를 보인 것은 pEB2보다 pEB1의 vector 크기가 2 kb 이상 작기때문으로 추정된다.

재조합 plasmid 제조 및 *B. lactofermentum*의 DDH 활성

제조된 shuttle vector pEB1 및 pEB2를 이용하여 *ddh* 유전자를 함유한 재조합 plasmid를 제조하기 위하여, pXX14로부터의 *ddh* 유전자를 함유한 2.4 kb *Xho*I 단편을 회수하여 pEB1의 *Sal*I site내로 삽입하여 pRK1을 제조하였으며(Fig. 2A), 또한 pEB2를 *Sal*I으로 완전

Table 2. Transformation efficiency and DDH activity of *B. lactofermentum* KCTC1846 with plasmids

plasmid	recipient	transformation efficiency (transformants/ μ g DNA)	DDH sp. act. ^a (U/mg)
None	<i>B. lactofermentum</i> 1846		0.15
pEB1	<i>B. lactofermentum</i> 1846	7.5×10^3	0.14
pEB2	<i>B. lactofermentum</i> 1846	2.5×10^3	0.11
pRK1	<i>B. lactofermentum</i> 1846	20.0×10^3	1.09
pRK2	<i>B. lactofermentum</i> 1846	2.0×10^3	0.78

^aThe specific activities of DDH (DDH sp. act.) were expressed as units per milligram of protein.

절단시켜 대략 9 kb 단편을 agarose gel 상에서 회수한 후 2.4 kb *Xho*I 단편과 ligation하여 pRK2를 제조하였다 (Fig. 2B). *E. coli* JM109의 형질전환체로부터 plasmid DNA를 분리하고 여러 가지 제한효소로 절단시켜 agarose gel에서 전기영동시킨 결과 9.5 kb의 pRK1 및 11.4 kb의 pRK2가 제조되었음을 확인할 수 있었다.

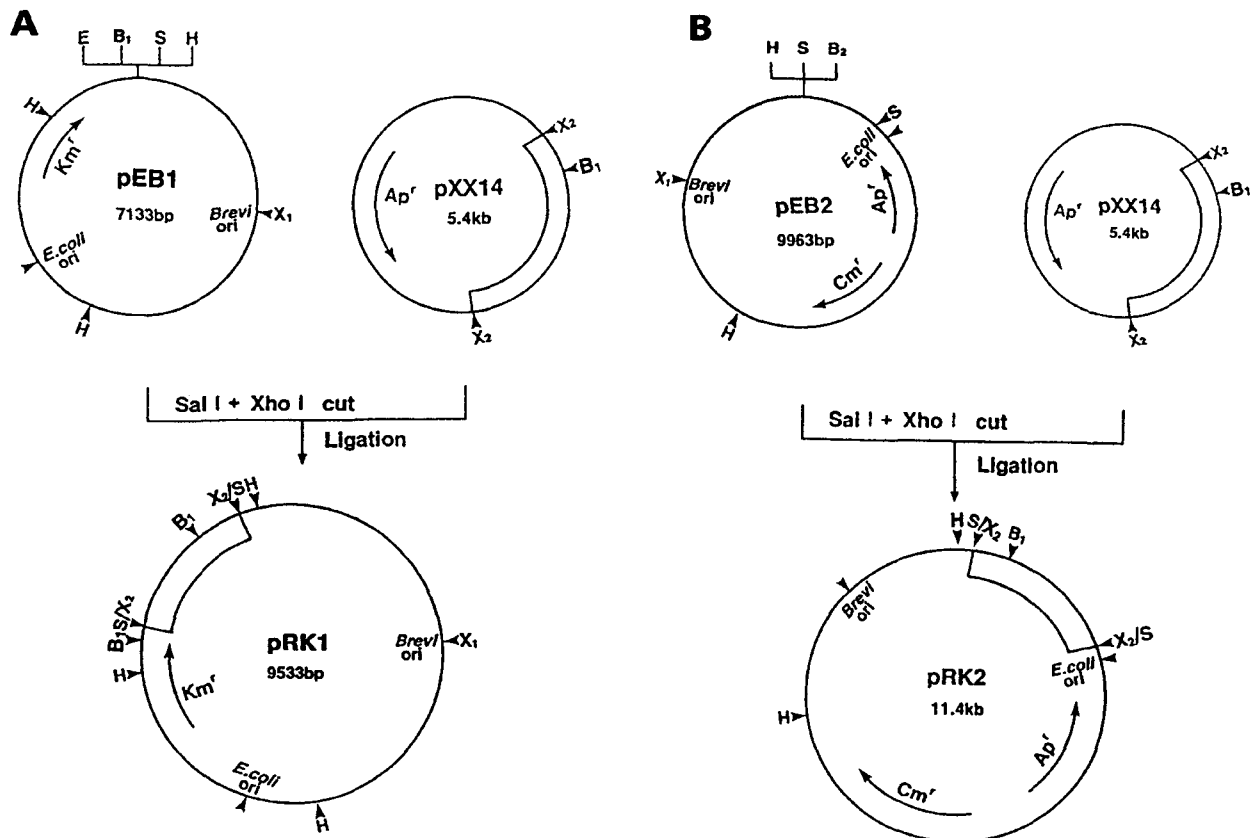
재조합 plasmid pRK1 및 pRK2에 의한 *B. lactofer-*

*mentum*의 형질전환율은 pRK2보다 pRK1에 의한 것이 10배정도 높았다 (Table 2).

ddh 유전자의 증폭에 의한 *B. lactofermentum*의 meso-DAP-dehydrogenase (DDH) 활성을 조사하기 위하여, AEC 내성균주인 *B. lactofermentum* KCTC1846 및 shuttle vector 혹은 재조합 plasmid를 함유한 *B. lactofermentum* KCTC1846으로부터 DDH의 활성을 측정하였다. Table 2에서 보는 것 처럼 대조균주로 사용한 AEC내성 균주와 shuttle vector를 함유한 균주간에는 서로 비슷한 수준의 활성을 나타내었으며, 재조합 plasmid pRK1 및 pRK2을 각각 함유한 *B. lactofermentum*의 DDH의 활성은 대조균주보다 7배 정도 증가하였다.

ddh 유전자의 증폭을 통한 *B. lactofermentum*의 L-lysine 생산

*B. lactofermentum*내에서 *ddh* 유전자의 증폭에 의한 lysine 생성량을 조사하기 위하여, *B. lactofermentum* 균주를 최소배지인 CGC에서 96시간 배양하여 균성장, glucose 소비량 및 lysine 생성량을 비교 분석하였다. Fig. 3에서 보는 것 처럼 재조합 plasmid를 함유한 균주

**Fig. 2. Construction of recombinant plasmid pRK1(A) and pRK2(B).**

The pRK1 and pRK2 were constructed by inserting the 2.4 kb *Xho*I fragment of pXX14 at the *Sal*I site of pEB1 and pEB2, respectively. B₁, *Bam*HI; B₂, *Bgl*II; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; S, *Sal*I; X₁, *Xba*I; X₂, *Xho*I.

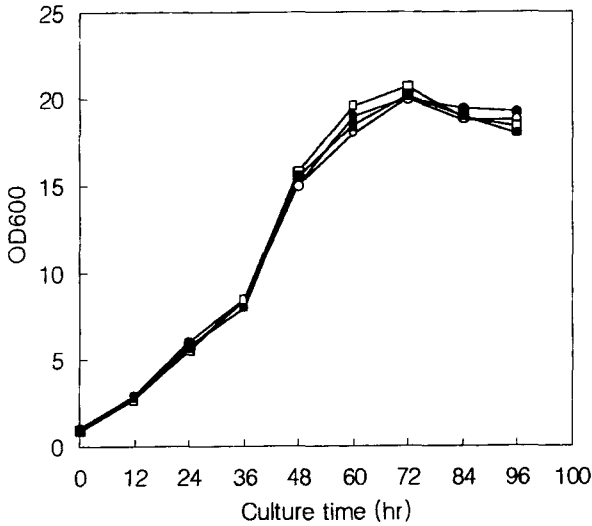


Fig. 3. Comparison of growth in *B. lactofermentum* KCTC 1846 harboring plasmid pEB1 (○), pEB2 (□), pRK1 (●), and pRK2 (■). OD, optical density.

의 성장은 shuttle vector를 함유한 대조균주와 거의 유사하므로 *ddh* gene의 증폭은 *B. lactofermentum*의 성장에 영향을 미치지 않는것으로 사료된다. 그러나 lysine 생성량의 비교 분석에서는 Fig. 4A에서 보는 것처럼 재조합 plasmid pRK1를 함유한 균주의 경우 48시간 이후부터 대조균주보다 lysine 생성량이 증가하기 시작하여 72시간 때에는 최대치를 나타내었으며 그 이후는 오히려 감소하였다. 최대치를 나타낸 72시간 때의 lysine 생성량은 대조균주가 4.38 g/l이었으며 pRK1을 함유한 균주는 5.34 g/l이었다. 또한 재조합 plasmid pRK2를 함유한 균주에서도 pRK1의 경우처럼 거의 유사한 양상을 나타내었으며 72시간 때의 lysine 생성량은 대조균주가 4.30 g/l이었으며 pRK2를 함유한 균주는 5.07 g/l이었다 (Fig. 4B). 이상의 실험결과로 미루어 볼 때 *ddh* gene의 증폭에 의한 *B. lactofermentum*의 lysine 생성량은 pRK1 및 pRK2에서 대조균주보다 각각 20% 및 18% 증가하였다.

요 약

본 연구는 *B. lactofermentum*에서 *ddh* 유전자의 증폭이 lysine 생성량에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 먼저 *E. coli*-*B. lactofermentum* shuttle vector pEB1 및 pEB2를 제조하였으며, 제조된 shuttle vector에 *ddh* 유전자를 ligation하여 재조합 plasmid pRK1 및 pRK2를 구축하였다. *B. lactofermentum*에서 *ddh* 유전자를 증폭시키기 위하여 재조합 plasmid를 *B. lactofermentum*으로 도입하여 DDH 활성을 측정할 결과 대조균주보다 7배정

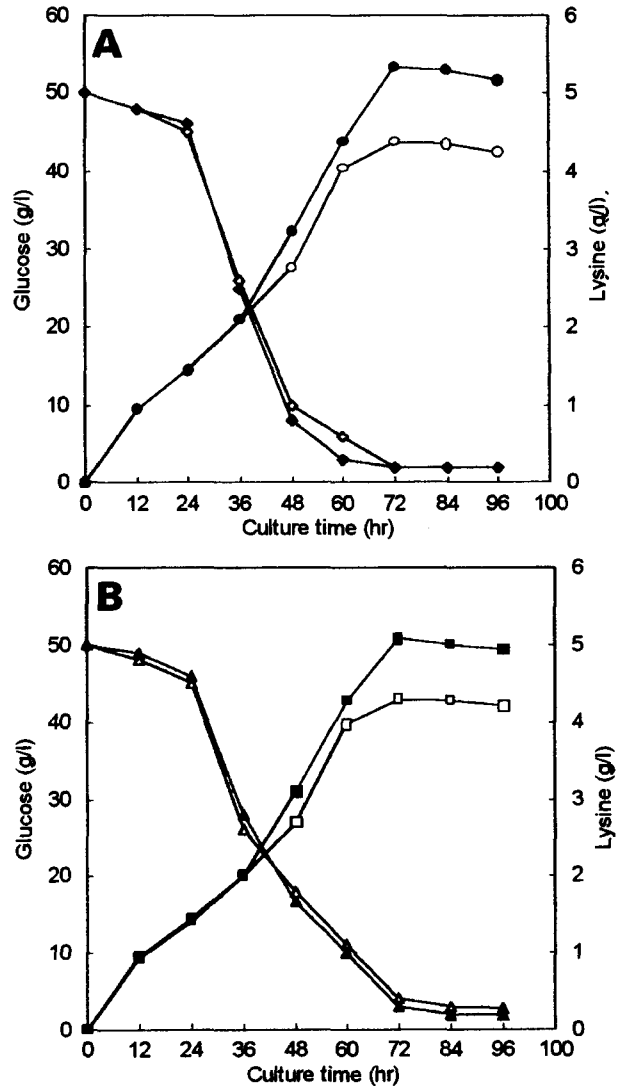


Fig. 4. Comparison of glucose consumption and lysine production in *B. lactofermentum* KCTC1846 harboring plasmids. (A) Glucose concentration (◆) and lysine production (●) in *B. lactofermentum* KCTC1846 harboring plasmid pEB1 (open symbols) and pRK1 (filled symbols). (B) Glucose concentration (▲) and lysine production (■) in *B. lactofermentum* KCTC1846 harboring plasmid pEB2 (open symbols) and pRK2 (filled symbols).

도 증가하였다. 또한 lysine 생성량의 비교 분석에서는 재조합 plasmid를 함유한 균주의 경우 48시간 이후부터 control 균주보다 lysine 생성량이 증가하기 시작하여 72시간 때에는 최대치를 나타내었으며 그 이후는 오히려 감소하였다. 최대치를 나타낸 72시간 때의 lysine 생성량은 대조균주가 4.30~4.38 g/l을 나타내었으며 pRK1 및 pRK2를 함유한 균주는 각각 5.34 g/l 및 5.07 g/l이었다. 이상의 결과로 미루어 볼 때 *ddh* 유전자의 증폭에 의한 *B. lactofermentum*의 lysine 생성량은 대조균주에 비하여 18~20% 정도 증가하였다.

감사의 글

본 연구는 농림부에서 지원하는 농림기술관리센터의 농림수산물특정연구과제의 연구비지원으로 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Barak, I., M. Koptides, M. Jucovic, M. Sisova, and J. Timko. 1990. Construction of a promoter-probe shuttle vector for *Escherichia coli* and *brevibacteria*. *Gene* **95**: 133–135.
- Berges, D. A., W. E. Dewolf, G. L. Dunn, D. J. Newman, S. J. Schmidt, J. J. Taggart, and C. Gilvarg. 1996. Studies on the active site of succinyl-CoA:Tetrahydrodipicolinate N-succinyl-transferase. *J. Biol. Chem.* **261**: 6160–6167.
- Birnboim, H. C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure of screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* **7**: 1513–1523.
- Bonnassie, S., J. F. Burini, J. Oreglia, A. Trautwetter, J. C. Patte, and A. M. Sicard. 1990. Transfer of plasmid DNA to *Brevibacterium lactofermentum* by electrotransformation. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 2107–2112.
- Cremer, J., C. Treptow, L. Eggeling, and H. Sahm. 1988. Regulation of enzyme of lysine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 3221–3229.
- Erdmann, A., B. Weil, and R. Kramer. 1994. Lysine secretion by *Corynebacterium glutamicum* wild type: Regulation of secretion carrier activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 604–610.
- Fernandez-Gonzalez, C., J. A. Gil, L. M. Mateos, A. Schwarzer, A. Schafer, J. Kalinowski, A. Puhler, and J. F. Martin. 1996. Construction of L-lysine-overproducing strains of *Brevibacterium lactofermentum* by targeted disruption of the *hom* and *thrB* genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**: 554–558.
- Jakoby, M., T. Martin, H. Sahm, R. Kramer, and A. Burkovski. 1997. Isolation of the *Corynebacterium glutamicum* *glnA* gene encoding glutamine synthetase I. *FEMS Microbiol. Lett.* **154**: 81–88.
- Kim, O. M., H. J. Kim, S. D. Kim, D. C. Park, and K. R. Lee. 1995. Cloning and sequencing of the *ddh* gene involved in the novel pathway of lysine biosynthesis from *Brevibacterium lactofermentum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **5**: 250–256.
- Kim, O. M., S. H. Park, and K. R. Lee. 1998. Site-specific inactivation of *meso*-diaminopimelate-dehydrogenase gene (*ddh*) in a lysine-producing *Brevibacterium lactofermentum*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**(5): 000–000.
- Kindler, S. H. and C. Gilvarg. 1960. N-succinyl-L- α , ϵ -diaminopimelate acid deacylase. *J. Biol. Chem.* **235**: 3532–3535.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265–275.
- Misono, H., M. Ogasawara, and S. Nagasaki. 1986. Characterization of *meso*-diaminopimelate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum* and its distribution in bacteria. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 2729–2734.
- Ozaki, A., R. Katsumata, T. Oka, and A. Furuya. 1984. Functional expression of the genes of *Escherichia coli* in gram-positive *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Gen. Genet.* **196**: 175–178.
- Patte, J. C. 1983. pp. 213–218. In K. M. Herrmann and R. L. Somerville (eds.), *Amino acid: Biosynthesis and Genetic Regulation*. Addison-Wesley Publishing Co., Massachusetts.
- Roh, J. H., O. M. Kim, D. C. Park, H. J. Kim, H. K. Yun, S. D. Kim, I. S. Lee, and K. R. Lee. 1994. Cloning and functional expression of the *ddh* gene involved in the novel pathway of lysine biosynthesis from *Brevibacterium lactofermentum*. *Mol. Cells* **4**: 295–299.
- Sambrook, J., E. T. Fritsh, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Santamaria, R., J. A. Gil, J. M. Mesae, and J. F. Martin. 1984. Characterization of an endogenous plasmid and development of cloning vectors and a transformation system in *Brevibacterium lactofermentum*. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 2237–2246.
- Santamaria, R. I., J. A. Gil, and J. H. Martin. 1985. High-frequency transformation of *Brevibacterium lactofermentum* protoplasts by plasmid DNA. *J. Bacteriol.* **162**: 463–467.
- Scapin, G., M. Cirilli, S. G. Reddy, Y. Gao, J. C. Vederas, and J. S. Blanchard. 1998. Substrate and inhibitor binding sites in *Corynebacterium glutamicum* diaminopimelate dehydrogenase. *Biochemistry* **37**: 3278–3285.
- Schrumpf, B., A. Schwarzer, J. Kalinowski, A. Puhler, L. Eggeling, and H. Sahm. 1991. A functionally split pathway for lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **173**: 4510–4516.
- Sonntag, K., L. Eggeling, A. D. Graaf, and H. Sahm. 1993. Flux partitioning in the split pathway of lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: Quantification by ^{13}C and ^1H -NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* **213**: 1325–1331.
- Sundharadas, G. and C. Gilvarg. 1967. Biosynthesis of 2, 6-diaminopimelate acid in *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.* **242**: 3983–3988.
- White, P. J. 1983. The essential role of diaminopimelate dehydrogenase in the biosynthesis of lysine by *Bacillus sphaericus*. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 739–749.
- Yeh, P., A. M. Sicard, and A. J. Sinskey. 1988. General organization of the genes specifically involved in the diaminopimelate-lysine biosynthetic pathway of *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Gen. Genet.* **215**: 105–111.

(Received July 31, 1998)