

형질전환된 *Escherichia coli* 변이주에서 Sodium citrate를 이용한 고농도 L-Threonine 생산

이만호 · 김병진 · 정월규¹ · 최선욱 · 박해룡 · 황용일*

경남대학교 식품생명공학부, ¹전북대학교 생물공정공학과

Received September 14, 2004 / Accepted October 1, 2004

Hyperproduction of L-Threonine by Adding Sodium Citrate as Carbon Source in Transformed *Escherichia coli* Mutant. Man-Hyo Lee, Byung-Jin Kim, Weol-Kyu Jeong¹, Sun-Uk Choi, Hae-Ryong Park and Yong-Il Hwang*. Division of food science and biotechnology, Kyungnam university, Masan 631-701, Korea, ¹Department of Bioprocess Engineering, Chunbuk National University, Chunju 561-756, Korea – The efficient fermentative production of L-threonine fermentation was achieved by using *Escherichia coli* MT201, transformed a plasmid carrying pyruvate carboxylase gene. It is an attempt to supply oxaloacetate to the L-threonine biosynthetic pathway. In order to improve the L-threonine productivity of *E. coli* MT201, a plasmid pPYC which is an expression vector of the pyruvate carboxylase gene of *Corynebacterium glutamicum*, was introduced. When *E. coli* MT/pPYC was incubated with medium containing only glucose as a carbon source, both the cell growth and L-threonine production were reduced, compared to the results from fermentation of *E. coli* MT201. In order to circumvent this effect, we attempted the addition of a mixed carbon source, composed of glucose and sodium citrate at a ratio of 1.5:3.5. It was shown that L-threonine production and cell growth (OD660) with *E. coli* MT/pPYC reached up to 75.7 g/l and 48, respectively, at incubation for 75 hr under fed-batch fermentation conditions. It is assumed that overproduction of L-threonine by anaplerotic pathway leads unbalance of TCA cycle and sodium citrate might play a role to recover normal TCA cycle.

Key words – *Escherichia coli* MT201, L-threonine, *E. coli* MT/pPYC, sodium citrate

Threonine은 인간이나 가축의 성장에 부족하기 쉬운 아미노산의 하나로서 가축의 사료, 식품 및 의약품 원료로도 널리 사용되어지는 필수 아미노산이다. 화학적 합성에 의해 생산된 threonine은 4개의 이성질체가 존재하기 때문에 순수한 L-형만을 선택적으로 분리하기가 쉽지 않다. 그러나 미생물의 발효법에 의해 생산된 threonine은 모두 L-형으로 화학적 합성에 의해 생산된 threonine보다 효과적이다. 또한 특정 아미노산을 값싼 원료로부터 단순한 공정에 의해서 높은 수율로 생산할 수 있으므로 공업적인 아미노산 생산에 널리 이용되고 있다[10].

아미노산 생합성 경로의 조절은 일반적으로 아미노산 analog 물질들에 의해 연구되었다[3,4,14]. α -Amino- β -hydroxyvaleric acid (AHV)는 세균의 성장을 억제하는 L-threonine analog 물질이며, 과잉 축적된 L-threonine에 의해 feedback inhibition을 받는 효소들은 AHV에 의해서도 활성이 저해된다[3,4,14]. AHV에 대한 내성 변이주는 *Escherichia coli*, *Brevibacterium* sp., 그리고 *Corynebacterium* sp. 같은 미생물들로부터 분리되어졌으며 이들 미생물의 특징은 L-threonine의 축적에 의한 feedback inhibition이 해제되는 점에 있다[1,2]. 따라서 AHV 내성 변이주의 분리는 L-threonine 대량 생산을 위한 방법으로 이용되고 있으며 이와 더불어 유전

자 재조합법[5,8,9]을 이용한 L-threonine 생산성 향상에 대한 연구는 주로 생합성에 직접 관여하는 효소군의 구조유전자 (*thr* operon)를 대량으로 발현시켜 L-threonine의 생산을 유도하고 있다. 하지만 이러한 방법들은 L-threonine의 대량 생산을 위하여 제작된 plasmid들의 배양 중 안정성이 문제점으로 지적된다. 이를 해결하기 위하여 *thr* operon을 함유한 plasmid[4,6]의 안정성을 높이기 위해 여러 방법이 보고되어 있다.

따라서 본 연구에서는 L-threonine 생산량을 증가시키기 위해 같은 aspartate 계열의 아미노산인 L-lysine에서 생산량 증가를 위해 시도된 바 있는 pyruvate carboxylase 유전자 [11,12]를 plasmid 형태(pPYC)로 L-threonine 생산균주인 *E. coli* MT201에 도입하여 재조합 균주인 *E. coli* MT/pPYC를 획득하였다. 그렇지만 재조합 균주인 *E. coli* MT/pPYC는 포도당을 첨가한 배지에서 모균주인 *E. coli* MT201보다 더 낮은 성장과 L-threonine 생산량을 보였다. 이를 해결하기 위해 새로운 기질로 sodium citrate를 선정하여 sodium citrate의 배지 중 적정농도 및 이를 이용한 배양 조건과 L-threonine 생산량에 관하여 연구하였다.

재료 및 방법

균주 및 plasmid

L-Threonine 생산을 위한 실험에 사용된 균주 및 plasmid

*Corresponding author

Tel : +82-55-249-2685, Fax : +82-55-249-2995

E-mail : yihwang@kyungnam.ac.kr

는 Table 1과 같다.

배지

E. coli 배양을 위한 일반배지는 Luria-Bertani 배지를 약간 변형한 배지(1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl)와 M9 최소배지(6 g/l Na₂HPO₄, 3 g/l KH₂PO₄, 0.5 g/l NaCl, 1 g/l NH₄Cl, 0.002 M MgSO₄, 0.4% 포도당, 0.0001 M CaCl₂)를 사용하였으며, 필요에 따라 ampicillin을 50 mg/l 첨가하여 사용하였다. 형질전환용 배지는 SOC 배지(2% tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM 포도당)를 사용하였다.

L-Threonine의 생산을 위한 플라스크용 배지는 liter당 70 g 포도당, 2 g yeast extract, 20 g (NH₄)₂SO₄, 1 g MgSO₄, 1.5 g KH₂PO₄, 10 mg FeSO₄, 30 g CaCO₃, 10 mg MnSO₄를 첨가한 배지를 사용하였고, 발효조 배양을 위한 종균 배지는 liter당 10 g 포도당, 10 g tryptone, 7 g yeast extract, 1 g (NH₄)₂SO₄, 10 g NaCl, 2 g KH₂PO₄의 조성으로 된 배지를 사용하였다. 발효조에서 L-threonine 생산에 사용된 배지는 liter당 50 g 포도당, 2.5 g yeast extract, 10 g (NH₄)₂SO₄, 1 g MgSO₄, 2 g KH₂PO₄, 10 mg FeSO₄, 5 mg MnSO₄를 첨가한 배지를 사용하였고 유가식 배양을 위한 첨가배지의 조성은 liter 당 40 g 포도당, 0.2 g methionine, 0.25 g KH₂PO₄이었다. 필요에 따라 ampicillin은 50 mg/l의 농도로 첨가하였다.

배양 조건

LB 한천 배지에서 18시간동안 배양한 균주를 50 ml 최소 배지를 함유한 500 ml baffle 플라스크에 접종하여 30°C 진탕 배양기(KSI-200L, Korea Science Co., Ltd.)에서 160 rpm의 조건으로 진탕 배양하였다. 24시간 배양 후 20 ml의 배양액을 200 ml의 종균배지가 들어있는 1 liter baffle 플라스크에 접종하여 최소배지의 배양 조건과 동일하게 유지하였다. 18시간 배양 후 200 ml의 배양액은 1.8 liter의 발효배지가 들어있는 5 liter 발효조(KFC LA-150, Kobiotech Co., Ltd.)에 첨가하였다. 배양 온도는 30°C, pH는 25% NH₄OH를 사용하여 6.0으로 일정하게 조절하였고 교반속도와 통기속도는 용존 산소의 농도가 20% 이상 유지되도록 적절하게 조절하였다.

분석방법

균체 농도는 배양액을 증류수로 적당히 희석한 후 spectrophotometer (JASCO V-530, JASCO Corporation, Japan)를 사용하여 660 nm에서 측정하였다. 포도당 농도는 YSI Glucose & Lactate Analyzer (YSI 2700 SELECT, Yellow Springs Instruments Co., USA)를 사용하여 분석하였으며, L-threonine 농도는 Kase의 ninhydrin 방법[3]을 변형하여 사용하였다.

결과 및 고찰

***E. coli* MT201과 재조합 균주인 *E. coli* MT/pPYC의 L-threonine 생산량 비교**

L-Threonine 생산균주인 *E. coli* MT201의 생육 및 L-threonine 생산량을 확인하기 위해 탄소원이 포도당으로 구성된 발효배지에서 유가식 배양을 실시하였다. 5 liter 발효조를 이용하여 유가식 배양을 실시한 결과 *E. coli* MT201의 경우에 총 배양 112시간 동안에 균체량은 흡광도(OD660)을 기준으로 약 52까지 증가하였고, 배양 중 L-threonine은 최고 57 g/l가 생산되었다(Fig. 1A).

L-Threonine의 대량생산을 위해서는 전구물질인 oxaloacetate의 과량생성이 필요하다. 이를 위하여 해당과정의 pyruvate로부터 직접 oxaloacetate를 생성하는 pyruvate carboxylase의 과량생산을 위한 발현용 plasmid, pPYC를 제작하였다(Fig. 2). Koffas 등[4]과 Peters-Wendisch 등[13]의 논문을 참조하여 양 말단에 HindIII 제한효소부위를 지니는 primer를 각각 제작하였다. 이들 primer로 *Corynebacterium glutamicum*으로부터 정제·회수된 염색체 DNA로부터 Takara LA Taq kit (Takara, Japan)를 이용하여 Delta Cycler II system (Ericomp, USA)으로 Takara사의 실험법에 따라 실시하여 *pyc* 유전자를 포함하며 HindIII의 제한효소부위를 양 말단에 지니는 약 3.4 kb의 DNA단편을 획득하였다. 이들 PCR 산물의 확인은 plasmid pUC19의 HindIII부위에 cloning하여 DNA sequencing을 통하여 *pyc* 유전자의 ORF임을 확인하였다(결과 미제시). 한편 4.2 kb의 *E. coli*에서 발현하는 plasmid pTrc99A를 먼저 제한효소 NcoI으로 절단하여 평활화시

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain and plasmid	Characteristics	Sources
strain		
<i>E. coli</i> MT201	AHV ^r , Met ^r , Ile ^L , DAP ^L , Asp ^r , Hom ^r	[7]
<i>E. coli</i> MT/pPYC	<i>E. coli</i> MT201 harboring plasmid pPYC	This work
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13831	donor strain for pyruvate carboxylase gene	ATCC
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB)</i>	Promega
plasmid		
pTrc99A	P _{trc} , Amp ^r , 4.2kb	Promega
pPYC	pyruvate carboxylase gene, P _{trc} , Amp ^r , 7.5kb	This work

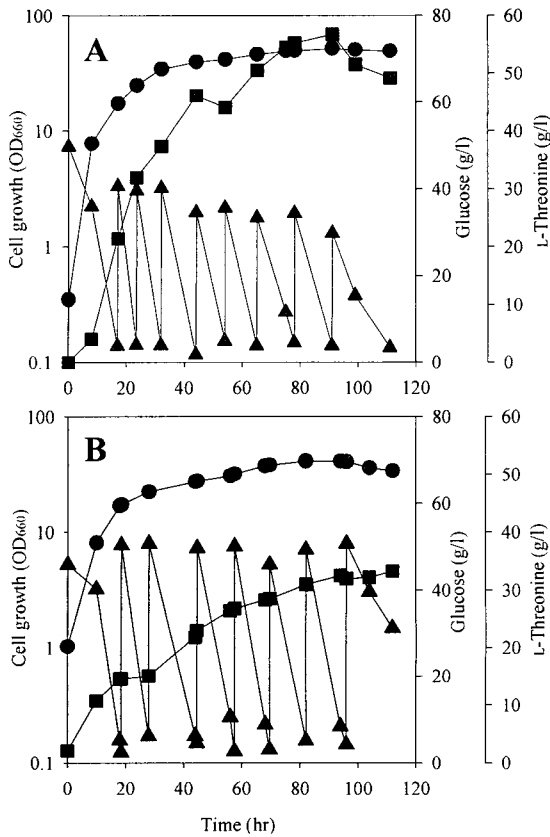


Fig. 1. Comparison of cell growth and L-threonine production on L-threonine fermentation between (A) *E. coli* MT201 and (B) *E. coli* MT/pPYC at 30°C in 5 liter jar fermenter. Glucose was initially added with 5% and intermittently with 4%. Symbols; ●, Cell growth; ◆, Glucose; ■, L-Threonine.

킨 후에 reading frame을 맞추기 위하여 *Hind*III 링커 (Takara, Japan)를 부착하여 최종적으로 제한효소 *Hind*III로 절단한 후에 이 부위에 상기의 pyruvate carboxylase 유전자를 포함하는 3.4 kb의 DNA 단편을 연결하여 7.5 kb의 expression plasmid pPYC를 제작하여 agarose gel상에서 확인하였다(결과 미제시).

상기의 방법으로 제작된 plasmid를 *E. coli* MT201에 도입하여 형질전환된 균주인 *E. coli* MT/pPYC를 획득하였다. *E. coli* MT/pPYC의 L-threonine 생산성을 확인하기 위해 모균주인 *E. coli* MT201의 배양 조건과 동일한 조건으로 유가식 배양을 실시하였다. 유가식 배양 결과 균체의 증식(OD660)은 총 배양 122시간에 약 41까지 증가하였고 L-threonine은 최고 36.5 g/l까지 생산되었다(Fig. 1B)

형질전환균주 *E. coli* MT/pPYC는 glucose하에서 *E. coli* MT201보다 균체 증식 및 L-threonine 생산량 모두가 감소되었다. 이는 포도당이 해당과정을 거쳐 TCA 회로를 회전하면서 생육에 필요한 전구체인 중간대사 산물을 공급해 주어야 하는데 pyruvate carboxylase에 의해서 oxaloacetate로의 공급은 원활하였으나 상대적으로 TCA 회로의 중간 대사산물의 공급이 원활하지 않아 균체의 생육이 억제 받았으며 이로 인하여 일차대사산물인 L-threonine 생산량이 감소한 것으로 추측된다.

플라스크 배양에서 균체 생육 및 L-threonine 생산에 대한 sodium citrate의 영향

TCA 회로 상의 중간대사 산물을 공급함으로써 *E. coli* MT/pPYC의 생육 및 L-threonine 생산에 대한 영향을 조사

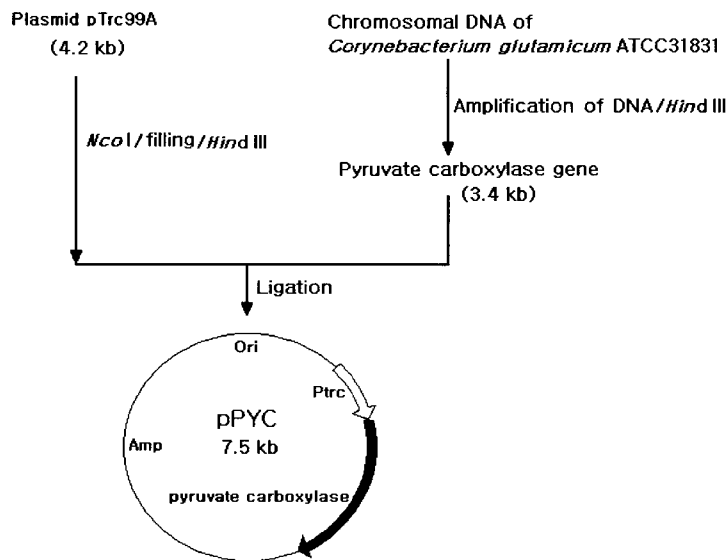


Fig. 2. The scheme of *pyc* gene cloning. Construction procedures are detailed in the text. Thin line is DNA originating from pTrc99A. The regions marked Ori, Ptrc and Amp are, respectively, the replication initiation site, the *trc* promoter and the ampicillin resistance gene of pTrc99A.

하기 위하여 citric acid를 포도당과 함께 공급하였다. 배양액 중의 pH를 고려하여 sodium citrate와 ammonium citrate의 영향을 각각 조사한 결과로부터 sodium 염이 ammonium 염보다 균체 증식 및 생산에 효율적임을 알 수 있었다(결과 미제시).

E. coli MT201과 *E. coli* MT/pPYC의 생육 및 L-threonine 생산에 필요한 탄소원으로 포도당을 첨가한 경우와 포도당과 sodium citrate를 함께 첨가한 경우를 각각 플라스크 상에서 비교하였다. 플라스크 배양에 사용된 탄소원은 각각 포도당(5%), 그리고 포도당(3%)+sodium citrate (2%)으로 하였다.

플라스크 배양 결과 모균주인 *E. coli* MT201에서 탄소원으로 포도당을 사용한 배양에서는 0.99 g/l의 L-threonine이 생산된 반면 2%의 sodium citrate를 같이 첨가한 배양에서는 탄소원으로 포도당을 첨가한 경우보다 훨씬 높은 4.18 g/l의 L-threonine이 생산되었다. L-Threonine 생산량의 증가뿐만 아니라 균체의 증식(OD660) 역시 3.02에서 8.76으로 증가하였다(Table 2).

재조합 균주인 *E. coli* MT/pPYC에서의 플라스크 배양 결과도 *E. coli* MT201을 이용한 배양의 경우와 유사한 결과를

Table 2. Effect of sodium citrate on cell growth and production of L-threonine in flask cultivation

Strain	Glucose ^a plus			
	None		Sodium citrate	
	Cell growth ^b	L-Threonine ^c	Cell growth	L-Threonine
<i>E. coli</i> MT201	3.02	0.99	8.76	4.18
<i>E. coli</i> MT/pPYC	2.66	1.05	8.05	4.37

^aFor none, glucose was added to 5%, and for sodium citrate (2%), glucose was added to 3%.

^bCell growth (A_{660}) at 40 hr.

^cL-Threonine (g/l) produced at 40 hr.

보였다. 따라서 L-threonine 생산량 증대를 목적으로 형질전환된 *E. coli* MT/pPYC 균주에 대해서 sodium citrate의 첨가가 L-threonine 생산량뿐만 아니라 균체 증식(OD660)에 대해서도 포도당을 탄소원으로 사용한 경우에 비해 더 좋은 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

L-Threonine 생산을 위한 포도당 및 sodium citrate의 최적 농도

플라스크 배양에서 *E. coli* MT/pPYC에 대한 탄소원으로 포도당과 sodium citrate를 혼합한 배양이 균주의 생육 및 L-threonine 생산에 있어 효과적임을 확인하였다. 균주의 생육 및 L-threonine 생산에 영향을 주는 탄소원의 최적 농도를 결정하기 위해 포도당과 sodium citrate를 5% 이내에서 다양한 농도비로 첨가하였다.

플라스크 상에서 포도당과 sodium citrate의 농도비(4:1, 3.5:1.5, 3:2, 2.5:2.5, 2:3)를 다르게 하여 배양을 실시한 결과 균주의 생육은 배양 전반에 걸쳐 유사한 증식형태를 보였다. L-Threonine 생산성을 검토하면 sodium citrate의 농도가 높을수록 초기 L-threonine 생산량은 증가되었으나 특히 포도당과 sodium citrate의 농도비가 3.5:1.5의 비율로 첨가되었을 때 가장 높은 생산량(5.14 g/l)을 보였다(Table 3).

L-Threonine 생산량과 마찬가지로 균체의 생육 역시 포도당과 sodium citrate의 농도비 3.5:1.5의 비율로 첨가되었을 때 L-threonine 생산 균주의 생육이 가장 좋았다(Table 4). 그렇지만 포도당과 sodium citrate의 농도비가 2:3의 비율로 첨가되었을 때에는 배양 32시간 이후부터 생육이 감소하는 경향을 보였는데 이는 포도당의 고갈에 의한 것으로 추측된다(Table 4).

유가식 배양에서 *E. coli* MT/pPYC의 L-threonine 생산 상기 실험에서 확인된 최적의 포도당과 sodium citrate의 첨가비(3.5:1.5)를 이용하여 5 liter 발효조에서 유가식 배양에

Table 3. L-Threonine production of *E. coli* MT/pPYC with various mixtures of glucose and sodium citrate in flask cultivation

Culture time (h)	L-Threonine production (g/l)					
	2.0:3.0	2.5:2.5	3.0:2.0	3.5:1.5	4.0:1.0	5.0:0.0
24	3.45	3.67	3.52	3.09	2.71	0.72
32	3.62	3.78	4.05	5.07	3.41	0.69
48	3.79	4.16	4.51	5.14	3.58	0.97

Table 4. Cell growth of *E. coli* MT/pPYC with various mixtures of glucose and sodium citrate at in flask cultivation

Culture time (h)	Cell growth (OD ₆₆₀)					
	2.0:3.0	2.5:2.5	3.0:2.0	3.5:1.5	4.0:1.0	5.0:0.0
24	8.426	8.716	8.498	8.544	8.218	2.319
32	7.642	8.560	8.800	9.447	8.404	2.413
48	7.565	9.356	8.641	9.688	8.908	2.932

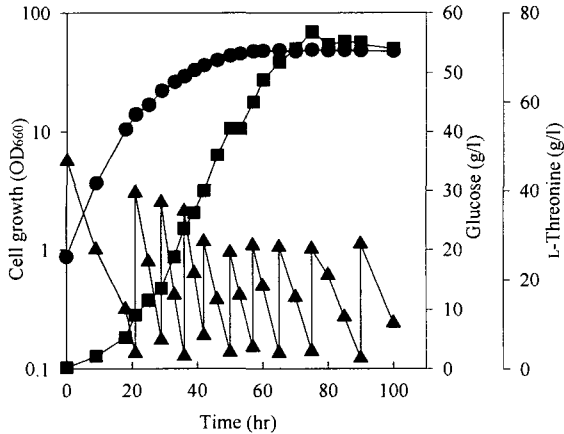


Fig. 3. Time course of cell growth and L-threonine production by *E. coli* MT/pPYC under optimal concentration of glucose and sodium citrate (3.5:1.5 ratio) at 30°C in 5 liter jar fermenter. Symbols: ●, Cell growth; ▲, Glucose; ■, L-Threonine.

의한 재조합 균주 *E. coli* MT/pPYC의 L-threonine 생산량을 확인하였다. 첨가배지는 탄소원인 포도당의 농도가 발효조 내에서 5 g/l이하로 되었을 때 간헐적으로 공급하였다.

유가식 배양의 결과 Fig. 3에서 보는바와 같이 배양 21시간부터 첨가배지를 공급하였다. L-Threonine 생산 균주의 생육은 배양 60시간동안에 흡광도(OD₆₆₀)를 기준으로 약 48까지 증가하였다. 또, L-threonine 생산은 배양 75시간동안 약 76 g/l까지 증가되어 최고의 생산량을 보였다(Fig. 3). 이 때 L-threonine 생산성은 1.25 g/l/h로 최고의 값을 나타내었다.

요 약

유용성이 확보된 L-threonine의 효율적인 발효생산을 위하여 생산균주 *E. coli* MT201를 유전자재조합을 통하여 개량하고 적절한 탄소원을 발굴하여 전체적인 생산량 증대를 도모하였다. 먼저, 5 liter 발효조에서 유가식 배양을 통하여 생산 균주 *E. coli* MT201이 균체량이 52(OD₆₆₀)일때 57 g/l의 생산량을 보이는 것을 확인하였다. L-Threonine의 생산성 향상을 위하여 균체 내에서 생합성 전구물질인 oxaloacetate를 충분히 공급하기위해 *C. glutamicum* 유래의 pyruvate carboxylase의 유전자를 plasmid pPYC의 형태로 *E. coli* MT201에 도입하였다(*E. coli* MT/PYC). 그렇지만 *E. coli* MT/PYC을 배양한 결과로부터 *E. coli* MT201와 비교할 때 균체증식 및 생산량이 모두 감소하는 경향을 보였으며, 이를 해결하기 위하여 플라스크배양을 통하여 포도당과 sodium citrate를 1.5:3.5의 비율로 배지 중에 첨가하였을 때 이들 문제가 개선되는 것을 관찰하였다. 상기 비율의 탄소원 조건하에서 5 liter 발효조를 이용한 유가식 배양에서 배양 75시간제에 L-threonine의 생산량 및 균체량(OD₆₆₀)이 각각 75.7 g/l와 48

로 효율적으로 향상되는 것을 알 수 있었다. 이는 과도한 anaplerosis에 의한 TCA 회로의 불균형을 중간산물인 citric acid를 sodium citrate의 형태로 공급함으로써 *E. coli* MT/PYC에서 균체증식이 정상화됨을 의미한다.

감사의 글

본 연구는 경남대학교 학술논문게재연구비 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- Farfán, M. J. and I. S. Calderón. 2000. Enrichment of threonine content in *Saccharomyces cerevisiae* by pathway engineering. *Enzyme Microbiol. Tech.* **26**, 763-770.
- Herrmann, K. M. and R. L. Somerville. 1983. Amino acids biosynthesis and genetic regulation. pp. 147-187, Addison-Wesley Publishing Company Inc., Massachusetts.
- Kase, H. and K. Nakayama. 1972. Production of L-threonine by analog-resistant mutants. *Agric. Biol. Chem.* **36**, 1611-1621.
- Koffas, M. A. G., R. Ramamoorthi, W. A. Pine, A. J. Sinskey and G. Stephanopoulos. 1998. Sequence of the *Corynebacterium glutamicum* pyruvate carboxylase gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 346-352.
- Lee, J. H., J. W. Oh, H. H. Lee and H. H. Hyun. 1991. Production of L-threonine by auxotrophs and analogue resistant mutants of *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**(6), 583-587.
- Lee, J. H., J. W. Oh, K. S. Noh, H. H. Lee, and J. H. Lee. 1992. Construction of L-threonine overproducing *Escherichia coli* by cloning of the threonine operon. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2**(4), 243-247.
- Lee, M. H., H. W. Lee, B. J. Kim, C. S. Kim, J. K. Jung, and Y. I. Hwang. 2004. High production of L-threonine using controlled feeding of L-methionine and phosphate by *Escherichia coli* mutant. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **32**(2), 149-153.
- Leuchtenberger, W. 1996. Amino acids. Technical production and use, pp. 465-502, In M. Roehr (ed.), *Biotechnology*. VCH, Weinheim. Germany.
- Miwa, K., S. Nakamori, K. Sano and H. Momose. 1984. Stability of recombinant carrying the threonine operon in *Escherichia coli*. *Agr. Biol. Chem.* **48**, 2233-2237.
- Miwa, K., T. Tsuchida, O. Kurahashi, S. Nakamori, K. Sano and H. Momose. 1983. Construction of L-threonine overproducing strains of *Escherichia coli* K-12 using recombinant DNA techniques. *Agr. Biol. Chem.* **47**, 2329-2334.
- Okamoto, K., K. Kino and M. Ikeda. 1997. Hyperproduction of L-threonine by an *Escherichia coli* mutant with impaired L-threonine uptake. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 1877-1882.
- Peters-Wendish, P. G., C. Kreuter, J. Kalinowski, M. Patek, H. Sahm and J. E. Bernhard. 1998. Pyruvate carboxylase

- from *Corynebacterium glutamicum*: Characterization, expression and inactivation of the *pyc* gene. *Microbiology* **114**, 915-927.
13. Peters-Wendisch, P. G., V. F. Wendisch, S. Paul, B. J. Eikmanns and H. Sahm. 1997. Pyruvate carboxylase as an anaplerotic enzyme in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* **143**, 1095-1103.
14. Shio, I. and S. Nakamori. 1969. Microbial production of L-threonine. Part I. Production by *Escherichia coli* mutant resistant to α -amino- β -hydroxyvaleric acid. *Agr. Biol. Chem.* **33**(8), 1152-1160.