



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 103 61 268 A1** 2005.07.28

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **103 61 268.8**
(22) Anmeldetag: **24.12.2003**
(43) Offenlegungstag: **28.07.2005**

(51) Int Cl.7: **C12N 1/00**
C12P 13/04, C12P 13/08

(71) Anmelder:
Degussa AG, 40474 Düsseldorf, DE

(72) Erfinder:
Dusch, Nicole, Dr., 33824 Werther, DE

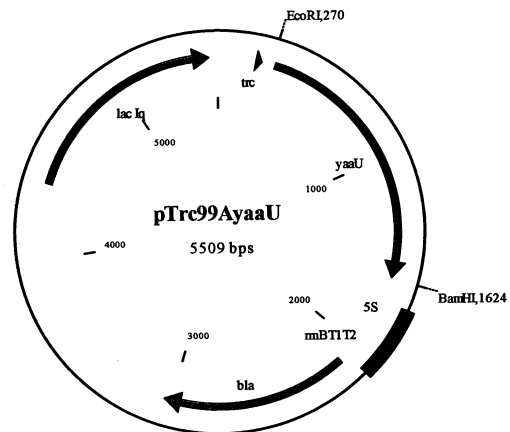
Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren durch Fermentation von rekombinanten Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, dadurch gekennzeichnet, dass man

a) die die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Mikroorganismen, in denen man den yaaU-ORF für die Geneprodukte kodierenden Nukleotidsequenzen oder Allele verstärkt, insbesondere überexprimiert, in einem Medium kultiviert unter Bedingungen, bei denen die gewünschte L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen angereichert wird, und

b) die gewünschte L-Aminosäure isoliert, wobei gegebenenfalls Bestandteile der Fermentationsbrühe und/oder die Biomasse in ihrer Gesamtheit oder Anteilen (≥ 0 bis 100%) im isolierten Produkt verbleiben oder vollständig entfernt werden.



Beschreibung

[0001] Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae, in denen der offene Leserahmen (ORF) mit der Bezeichnung yaaU verstärkt wird.

Stand der Technik

[0002] L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

[0003] Es ist bekannt, dass L-Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen der Enterobacteriaceae, insbesondere Escherichia coli (E. coli) und Serratia marcescens, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen, wie z.B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie z.B. die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform, durch z.B. Ionenaustauschchromatographie, oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

[0004] Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z.B. das Threonin-Analogon α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure (AHV) oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und L-Aminosäuren wie z.B. L-Threonin produzieren.

[0005] Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung L-Aminosäuren produzierender Stämme der Familie Enterobacteriaceae eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Produktion untersucht. Zusammenfassende Informationen zur Zell- und Molekularbiologie von Escherichia coli und Salmonella sind in Neidhardt (ed): Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology, 2nd edition, ASM Press, Washington, D.C., USA, (1996) zu finden.

Aufgabe der Erfindung

[0006] Die Erfinder haben sich die Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

[0007] Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, unter Verwendung von Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, die insbesondere bereits L-Aminosäuren produzieren, und in denen mindestens der offene Leserahmen yaaU, oder für dessen Genprodukt kodierende Nukleotidsequenz oder dessen Allele verstärkt wird bzw. werden.

[0008] Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist L-Threonin.

[0009] Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität oder Konzentration eines oder mehrerer Enzyme oder Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene, des ORFs bzw. der ORFs um mindestens eine (1) Kopie erhöht, einen starken Promotor oder ein Gen oder Allel oder ORF verwendet, das für ein entsprechendes Enzym bzw. Protein mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

[0010] Als offener Leserahmen (ORF, open reading frame) wird ein Abschnitt einer Nukleotidsequenz bezeichnet, der für ein Protein beziehungsweise Polypeptid oder Ribonukleinsäure kodiert oder kodieren kann, dem (der) nach dem Stand der Technik keine Funktion zugeordnet werden kann. Nach Zuordnung einer Funktion zu dem betreffenden Abschnitt der Nukleotidsequenz wird im allgemeinen von einem Gen gesprochen. Unter Allelen versteht man im allgemeinen alternative Formen eines gegebenen Gens. Die Formen zeichnen

sich durch Unterschiede in der Nukleotidsequenz aus.

[0011] Als Genprodukt bezeichnet man im Allgemeinen das von einer Nukleotidsequenz, d.h. einem ORF, einem Gen oder einem Allel kodierte Protein oder die kodierte Ribonukleinsäure

[0012] Durch die Maßnahmen der Verstärkung, insbesondere Überexpression, wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen um mindestens 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% oder 500%, maximal bis 1000 oder 2000 bezogen auf die des Wildtyp-Proteins beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus erhöht. Als Ausgangs-Mikroorganismus wird der Mikroorganismus verstanden, an dem die erfinderischen Maßnahmen durchgeführt werden.

[0013] Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren durch Fermentation von rekombinanten Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, dadurch gekennzeichnet, dass man

- a) die gewünschten L-Aminosäure produzierenden Mikroorganismen, in denen man den offenen Leserahmen yaaU oder für das Genprodukte kodierende Nukleotidsequenzen oder Allele verstärkt, insbesondere überexprimiert, in einem Medium kultiviert unter Bedingungen, bei denen die gewünschte L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen angereichert wird und,
- b) die gewünschte L-Aminosäure isoliert, wobei gegebenenfalls Bestandteile der Fermentationsbrühe und/oder die Biomasse in ihrer Gesamtheit oder Anteilen (≥ 0 bis 100 %) im isolierten Produkt verbleiben oder vollständig entfernt werden.

[0014] Die insbesondere rekombinanten Mikroorganismen, die ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, gegebenenfalls Stärke, gegebenenfalls Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es handelt sich um Vertreter der Familie Enterobacteriaceae, ausgewählt aus den Gattungen Escherichia, Erwinia, Providencia und Serratia. Die Gattungen Escherichia und Serratia werden bevorzugt. Bei der Gattung Escherichia ist insbesondere die Art Escherichia coli und bei der Gattung Serratia insbesondere die Art Serratia marcescens zu nennen.

[0015] Rekombinante Mikroorganismen werden im allgemeinen durch Transformation, Transduktion oder Konjugation mit einem das gewünschte Gen tragenden Vektor erzeugt.

[0016] Geeignete, insbesondere L-Threonin produzierende Stämme der Gattung Escherichia, insbesondere der Art Escherichia coli sind beispielsweise

- Escherichia coli H4581 (EP 0 301 572)
- Escherichia coli KY10935 (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61(11):1877-1882 (1997))
- Escherichia coli VNIIgenetika MG442 (US-A-4278,765)
- Escherichia coli VNIIgenetika M1 (US-A-4,321,325)
- Escherichia coli VNIIgenetika 472T23 (US-A-5,631,157)
- Escherichia coli BKIIM B-3996 (US-A-5,175,107)
- Escherichia coli kat 13 (WO 98/04715)
- Escherichia coli KCCM-10132 (WO 00/09660)

[0017] Geeignete L-Threonin produzierende Stämme der Gattung Serratia, insbesondere der Art Serratia marcescens sind beispielsweise

- Serratia marcescens HNr21 (Applied and Environmental Microbiology 38(6): 1045-1051 (1979))
- Serratia marcescens TLR15b (Gene 57(2-3): 151-158 (1987))
- Serratia marcescens T-2000 (Applied Biochemistry and Biotechnology 37(3): 255-265 (1992))

[0018] L-Threonin produzierende Stämme aus der Familie der Enterobacteriaceae besitzen bevorzugt, unter anderen, ein oder mehrere der genetischen bzw. phänotypischen Merkmale ausgewählt aus der Gruppe: Resistenz gegen α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure, Resistenz gegen Thialysin, Resistenz gegen Ethionin, Resistenz gegen α -Methylserin, Resistenz gegen Diaminobernsteinsäure, Resistenz gegen α -Aminobuttersäure, Resistenz gegen Borrelidin, Resistenz gegen Cyclopentan-Carboxylsäure, Resistenz gegen Rifampicin, Resistenz gegen Valin-Analoga wie beispielsweise Valinhydroxamat, Resistenz gegen Purinanaloga wie beispielsweise 6-Dimethylaminopurin, Bedürftigkeit für L-Methionin, gegebenenfalls partielle und kompensierbare Bedürftigkeit für L-Isoleucin, Bedürftigkeit für meso-Diaminopimelinsäure, Auxotrophie bezüglich Threonin-haltiger Dipeptide, Resistenz gegen L-Threonin, Resistenz gegen Threonin-Raffinat, Resistenz gegen L-Homoserin, Resistenz gegen L-Lysin, Resistenz gegen L-Methionin, Resistenz gegen L-Glutaminsäure, Resistenz

gegen L-Aspartat, Resistenz gegen L-Leucin, Resistenz gegen L-Phenylalanin, Resistenz gegen L-Serin, Resistenz gegen L-Cystein, Resistenz gegen L-Valin, Empfindlichkeit gegenüber Fluoropyruvat, defekte Threonin-Dehydrogenase, gegebenenfalls Fähigkeit zur Saccharose-Verwertung, Verstärkung des Threonin-Operons, Verstärkung der Homoserin-Dehydrogenase I-Aspartatkinase I bevorzugt der feed back resistenten Form, Verstärkung der Homoserinkinase, Verstärkung der Threoninsynthase, Verstärkung der Aspartatkinase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form, Verstärkung der Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase, Verstärkung der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form, Verstärkung der Phosphoenolpyruvat-Synthase, Verstärkung der Transhydrogenase, Verstärkung des RhtB-Genproduktes, Verstärkung des RhtC-Genproduktes, Verstärkung des YfiK-Genproduktes, Verstärkung einer Pyruvat-Carboxylase, und Abschwächung der Essigsäurebildung.

[0019] Es wurde gefunden, dass Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae nach Überexpression des Gens oder offenen Leserahmens (ORF) yaaU, oder dessen Allele, in verbesserter Weise L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin produzieren.

[0020] Die Nukleotidsequenzen der Gene oder offenen Leserahmen (ORF) von Escherichia coli gehören zum Stand der Technik und können der von Blattner et al. (Science 277: 1453-1462 (1997)) publizierten Genomsequenz von Escherichia coli entnommen werden.

[0021] Der yaaU-ORF von Escherichia coli K12 wird unter anderem durch folgende Angaben beschrieben:

Bezeichnung:	offener Leserahmen
Funktion:	putativer Zucker Transporter
Beschreibung:	der offene Leserahmen yaaU kodiert für ein 48,7 KDa Protein, der isoelektrische Punkt liegt bei 8.8; chromosomal lokalisiert liegt yaaU beispielsweise bei Escherichia coli K12 MG1655 in der intergenischen Region der Gene carB, kodierend für die lange Kette der Carbamoyl-Phosphate Synthase und kefC, kodierend für ein (K+)/H(+)-Glutathione-regulated Potassium-Efflux System Protein
Referenz:	Blattner et al.; Science 277(5331): 1453-1474 (1997)
Accession No.:	AE000114
Alternativer Genname:	B0045

[0022] Die Nukleinsäuresequenzen können den Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI) der National Library of Medicine (Bethesda, MD, USA), der Nukleotidsequenz-Datenbank der European Molecular Biology Laboratories (EMBL, Heidelberg, Deutschland bzw. Cambridge, UK) oder der DNA Datenbank von Japan (DDBJ, Mishima, Japan) entnommen werden.

[0023] Der besseren Übersichtlichkeit halber ist die bekannte Sequenz zum yaaU-ORF unter der SEQ ID NO:3 dargestellt. Das von diesem Leserahmen kodierte Protein ist als SEQ ID NO:4 dargestellt.

[0024] Die in den angegebenen Textstellen beschriebenen offenen Leserahmen können erfindungsgemäß verwendet werden.

[0025] Weiterhin können Allele der Gene oder offene Leserahmen verwendet werden, die sich aus der Degeneriertheit des genetischen Codes oder durch funktionsneutrale Sinnmutationen („sense mutations“) ergeben. Die Verwendung endogener Gene bzw. endogener offener Leserahmen wird bevorzugt.

[0026] Unter „endogenen Genen“ oder „endogenen Nukleotidsequenzen“ versteht man die in der Population einer Art vorhandenen Gene oder offene Leserahmen oder Allele beziehungsweise Nukleotidsequenzen.

[0027] Zu den Allelen, welche funktionsneutrale Sinnmutationen enthalten, zählen unter anderem solche, die zu mindestens einem konservativen Aminosäureaustausch in dem von ihnen kodierten Protein führen.

[0028] Bei den aromatischen Aminosäuren spricht man von konservativen Austauschen wenn Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin gegeneinander ausgetauscht werden. Bei den hydrophoben Aminosäuren spricht man von konservativen Austauschen wenn Leucin, Isoleucin und Valin gegeneinander ausgetauscht werden. Bei den polaren Aminosäuren spricht man von konservativen Austauschen wenn Glutamin und Asparagin gegen-

einander ausgetauscht werden. Bei den basischen Aminosäuren spricht man von konservativen Austauschungen wenn Arginin, Lysin und Histidin gegeneinander ausgetauscht werden. Bei den sauren Aminosäuren spricht man von konservativen Austauschungen wenn Asparaginsäure und Glutaminsäure gegeneinander ausgetauscht werden. Bei den Hydroxyl-Gruppen enthaltenden Aminosäuren spricht man von konservativen Austauschungen wenn Serin und Threonin gegeneinander ausgetauscht werden.

[0029] In gleicher Weise können auch solche Nukleotidsequenzen verwendet werden, die für Varianten der genannten Proteine kodieren, die zusätzlich am N- oder C-Terminus eine Verlängerung oder Verkürzung um mindestens eine (1) Aminosäure enthalten. Diese Verlängerung oder Verkürzung beträgt nicht mehr als 50, 40, 30, 20, 10, 5, 3 oder 2 Aminosäuren oder Aminosäurereste.

[0030] Zu den geeigneten Allelen zählen auch solche, die für Proteine kodieren, in denen mindestens eine (1) Aminosäure eingefügt (Insertion) oder entfernt (Deletion) ist. Die maximale Anzahl derartige als Indels bezeichneter Veränderungen kann 2, 3, 5, 10, 20 in keinem Falle aber mehr als 30 Aminosäuren betreffen.

[0031] Zu den geeigneten Allelen gehören ferner solche die durch Hybridisierung, insbesondere unter stringenten Bedingungen unter Verwendung von SEQ ID No. 3 oder Teilen davon insbesondere der Kodierregionen bzw. der dazu komplementären Sequenzen, erhältlich sind.

[0032] Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heißt, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschritte durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird im Allgemeinen bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschritten durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

[0033] Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein Puffer entsprechend 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50°C-68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50°C-68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf eine Konzentration entsprechend 0,2x SSC oder 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1-2°C von 50°C auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% oder mindestens 96% bis 99% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

[0034] Zur Erzielung einer Verstärkung können beispielsweise die Expression der Gene oder offenen Leserahmen oder Allele oder die katalytischen Eigenschaften des Proteins erhöht werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.

[0035] Zur Erzielung einer Überexpression kann beispielsweise die Kopienzahl der entsprechenden Gene oder offenen Leserahmen erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen L-Threonin-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

[0036] Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Chang und Cohen (Journal of Bacteriology

134: 1141-1156 (1978)), bei Hartley und Gregori (Gene 13: 347-353 (1981)), bei Amann und Brosius (Gene 40: 183-190 (1985)), bei de Broer et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 80: 21-25 (1983)), bei LaVallie et al. (BIO/TECHNOLOGY 11: 187-193 (1993)), in PCT/US97/13359, bei Llosa et al. (Plasmid 26: 222-224 (1991)), bei Quandt und Klipp (Gene 80: 161-169 (1989)), bei Hamilton et al. (Journal of Bacteriology 171: 4617-4622 (1989)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191-195 (1998)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

[0037] In Enterobacteriaceae replizierbare Plasmidvektoren wie z.B. von pACYC184 abgeleitete Kloniervektoren (Bartolomé et al.; Gene 102: 75-78 (1991)), pTrc99A (Amann et al.; Gene 69: 301-315 (1988)) oder pSC101-Derivate (Vocke und Bastia; Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80(21): 6557-6561 (1983)) können verwendet werden. In einem erfindungsgemäßen Verfahren kann man einen mit einem Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzen, wobei der Plasmidvektor mindestens eine für den *yaaU*-ORF, oder für dessen Genprodukt kodierende Nukleotidsequenz oder Allel trägt.

[0038] Unter dem Begriff Transformation versteht man die Aufnahme einer isolierten Nukleinsäure durch einen Wirt (Mikroorganismus).

[0039] Es ist ebenfalls möglich, Mutationen, welche die Expression der jeweiligen Gene oder offenen Leserahmen betreffen, durch Sequenzaustausch (Hamilton et al.; Journal of Bacteriology 171: 4617-4622 (1989)), Konjugation oder Transduktion in verschiedene Stämme zu überführen.

[0040] Nähere Erläuterungen zu den Begriffen der Genetik und Molekularbiologie findet man in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie beispielsweise dem Lehrbuch von Birge (Bacterial and Bacteriophage Genetics, 4th ed., Springer Verlag, New York (USA), 2000) oder dem Lehrbuch von Berg, Tymoczko and Stryer (Biochemistry, 5th ed., Freeman and Company, New York (USA), 2002) oder dem Handbuch von Sambrook et al. (Molekular Cloning, A Laboratory Manual, (3-Volume Set), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001).

[0041] Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin mit Stämmen der Familie Enterobacteriaceae vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des offenen Leserahmens *yaaU*, ein oder mehrere Enzyme des bekannten Threonin-Biosyntheseweges oder Enzyme des anaplerotischen Stoffwechsels oder Enzyme für die Produktion von reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat oder Enzyme der Glykolyse oder PTS-Enzyme oder Enzyme des Schwefelstoffwechsels zu verstärken. Die Verwendung endogener Gene wird im allgemeinen bevorzugt.

[0042] So können beispielsweise gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Aspartatkinase, die Homoserin-Dehydrogenase, die Homoserinkinase und die Threoninsynthase kodierende *thrABC*-Operon (US-A-4,278,765),
- das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende *pyc*-Gen von *Corynebacterium glutamicum* (WO 99/18228),
- das für die Phosphoenolpyruvat-Synthase kodierende *pps*-Gen (Molecular and General Genetics 231(2): 332-336 (1992)),
- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase kodierende *ppc*-Gen (WO 02/064808),
- die für die Transhydrogenase kodierenden Gene *pntA* und *pntB* (European Journal of Biochemistry 158: 647-653 (1986)),
- das Homoserinresistenz vermittelnde Gen *rhtB* (EP-A-0 994 190),
- das Threoninresistenz vermittelnde Gen *rhtC* (EP-A-1 013 765),
- das für das Threoninexport-Protein kodierende *thrE*-Gen von *Corynebacterium glutamicum* (WO 01/92545),
- das für die Glutamat-Dehydrogenase kodierende *gdhA*-Gen (Nucleic Acids Research 11: 5257-5266 (1983); Gene 23: 199-209 (1983)),
- das für die Phosphoglucomutase kodierende *pgm*-Gen (WO 03/004598),
- das für die Fructose Biphosphat Aldolase kodierende *fba*-Gen (WO 03/004664),
- das für die Phosphohistidin-Protein-Hexose-Phosphotransferase des Phosphotransferase-Systems PTS kodierende *ptsH*-Gen des *ptsHlcr*-Operons (WO 03/004674),
- das für das Enzym I des Phosphotransferase-Systems PTS kodierende *ptsI*-Gen des *ptsHlcr*-Operons (WO 03/004674),
- das für die Glucose-spezifische IIA Komponente des Phosphotransferase-Systems PTS kodierende *crr*-Gen des *ptsHlcr*-Operons (WO 03/004674),
- das für die Glucose-spezifische IIBC Komponente kodierende *ptsG*-Gen (WO 03/004670),
- das für den Regulator des Leucin-Regulons kodierende *lrp*-Gen (WO 03/004665),

- das für den Regulator des fad-Regulons kodierende fadR-Gen (WO 03/038106),
- das für den Regulator des zentralen Intermediärstoffwechsels kodierende iclR-Gen (WO 03/038106),
- das für die kleine Untereinheit der Alkyl Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpC-Gen des ahpCF-Operons (WO 03/004663),
- das für die große Untereinheit der Alkyl Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpF-Gen des ahpCF-Operons (WO 03/004663),
- das für die Cystein-Synthase A kodierende cysK-Gen (WO 03/006666),
- das für den Regulator des cys-Regulons kodierende cysB-Gen (WO 03/006666),
- das für das Flavoprotein der NADPH-Sulfit-Reduktase kodierende cysJ-Gen des cysJIH-Operons (WO 03/006666), • das für das Hämoprotein der NADPH-Sulfit-Reduktase kodierende cysI-Gen des cys-JIH-Operons (WO 03/006666),
- das für die Adenylylsulfat-Reduktase kodierende cysH-Gen des cysJIH-Operons (WO 03/006666),
- das für ein Membranprotein mit anti-sigmaE-Aktivität kodierende rseA-Gen des rseRBC-Operons (WO 03/008612),
- das für einen globalen Regulator des sigmaE-Faktors kodierende rseC-Gen des rseABC-Operons (WO 03/008612),
- das für die Decarboxylase Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucA-Gen des sucABCD-Operons (WO 03/008614),
- das für die Dihydrolipoyltranssuccinase E2 Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucB-Gen des sucABCD-Operons (WO 03/008614),
- das für die β -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende sucC-Gen des suc ABCD-Operons (WO 03/008615) • das für die α -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende sucD-Gen des sucABCD-Operons (WO 03/008615), • das für die E1-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodierende aceE-Gen (WO 03/076635),
- das für die E2-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodierende aceF-Gen (WO 03/076635),
- das für den Regulator der SigmaE-Faktor-Aktivität kodierende rseB-Gen (Molecular Microbiology 24(2): 355-371 (1997))

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

[0043] Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des offenen Leserahmens yaaU, eines oder mehrere der Gene ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-Gen (Journal of Bacteriology 169: 4716-4721 (1987)),
- das für die Malat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.37) kodierende mdh-Gen (Archives in Microbiology 149: 36-42 (1987)),
- das Genprodukt des offenen Leserahmens (ORF) yjfa (Accession Number AAC77180 des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA, WO 02/29080),
- das Genprodukt des offenen Leserahmens (ORF) ytfp (Accession Number AAC77179 des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA, WO 02/29080),
- das für das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende pckA-Gen (WO 02/29080),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende poxB-Gen (WO 02/3b797),
- das für den DgsA-Regulator des Phosphotransferase-Systems kodierende dgsA-Gen (WO 02/081721), das auch unter der Bezeichnung mlc-Gen bekannt ist,
- das für den Fructose-Repressor kodierende fruR-Gen (WO 02/081698), das auch unter der Bezeichnung cra-Gen bekannt ist,
- das für den Sigma³⁸-Faktor kodierende rpoS-Gen (WO 01/05939), das auch unter der Bezeichnung katF-Gen bekannt ist und
- das für die Aspartat Ammonium-Lyase kodierende aspA-Gen (WO 03/008603)

abzuschwächen, insbesondere auszuschalten oder die Expression zu verringern.

[0044] Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität oder Konzentration eines oder mehrerer Enzyme bzw. Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym bzw. Protein mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Enzym bzw. Protein oder den offenen Leserahmen oder das Gen inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

[0045] Durch die Maßnahmen der Abschwächung wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen auf 0 bis 75%, 0 bis 50%, 0 bis 25%, 0 bis 10% oder 0 bis 5% der Aktivität oder Konzentration des Wildtyp-Proteins, beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus, herabgesenkt.

[0046] Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des offenen Leserahmens yaaU, unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

[0047] Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können im batch – Verfahren (Satzkultivierung), im fed batch (Zulaufverfahren) oder im repeated fed batch-Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioproszesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

[0048] Das zu verwendende Kulturmedium muss in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen.

[0049] Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

[0050] Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und gegebenenfalls Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

[0051] Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

[0052] Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muss weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachstumsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

[0053] Die Fermentation wird im allgemeinen bei einem pH-Wert von 5,5 bis 9,0, insbesondere 6,0 bis 8,0, durchgeführt. Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 25°C bis 45°C und vorzugsweise bei 30°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum an L-Aminosäuren bzw. L-Threonin gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

[0054] Die Analyse von L-Aminosäuren kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry 30: 1190-1206 (1958)) beschrieben, oder sie kann durch reversed Phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry 51: 1167-1174 (1979)) beschrieben.

[0055] Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, wie bei-

spielsweise L-Threonin, L-Isoleucin, L-Valin, L-Methionin, L-Homoserin und L-Lysin, insbesondere L-Threonin.

[0056] Die vorliegende Erfindung wird im Folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

[0057] Verwendete Minimal- (M9) und Vollmedien (LB) für *Escherichia coli* sind von J.H. Miller (A short course in bacterial genetics (1992), Cold Spring Harbor Laboratory Press) beschrieben. Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* sowie alle Techniken zur Restriktion, Ligation, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung werden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning – A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press) durchgeführt. Die Transformation von *Escherichia coli* wird, wenn nicht anders beschrieben, nach Chung et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86: 2172-2175 (1989)) durchgeführt.

[0058] Die Bebrütungstemperatur bei der Herstellung von Stämmen und Transformanten ist 37°C.

Beispiel 1

Konstruktion des Expressionsplasmides pTrc99A_{yaaU}

[0059] Das *yaaU*-Gen aus *E. coli* K12 wird unter Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie synthetischen Oligonukleotiden amplifiziert. Ausgehend von der Nukleotidsequenz des *yaaU*-Gens in *E. coli* K12 MG1655 (Accession Number AE000114), Blattner et al. (Science 277: 1453-1474 (1997)) werden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland). Die Sequenzen der Primer werden so modifiziert, dass Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme entstehen. Für den *yaaU*-ex1-Primer wird die Erkennungssequenz für *EcoRI* und für den *yaaU*-ex2-Primer die Erkennungssequenz für *BamHI* gewählt, die in der unten dargestellten Nukleotidabfolge durch Unterstreichen markiert:

yaaU-ex1:

5' -GATCTGAATTCTAAGGAATARCCATGCAACCGTC- 3 (SEQ ID No. 1)

yaaU-ex2:

5' -GATCTAGGATCCCAATTTACCCATTCTCTGC- 3' (SEQ ID No. 2)

[0060] Die für die PCR eingesetzte chromosomale *E. coli* K12 MG1655 DNA wird nach Herstellerangaben mit „Qiagen Genomic-tips 100/G“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert. Ein ca. 1371 by grosses DNA-Fragment kann mit den spezifischen Primern unter Standard-PCR-Bedingungen (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) mit der Vent-DNA-Polymerase (New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland) amplifiziert werden (SEQ ID No. 3).

[0061] Das amplifizierte *yaaU*-Fragment wird dem Vektor pCR-Blunt II-TOPO (Zero TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Groningen, Niederlande) den Herstellerangaben entsprechend ligiert und in den *E. coli* Stamm TOP10 transformiert. Die Selektion Plasmid tragender Zellen erfolgt auf LB Agar, der mit 50 µg/ml Kanamycin versetzt ist. Nach der Plasmid DNA Isolierung wird der Vektor mit den Enzymen *EcoRV* und *EcoRI* gespalten und nach Überprüfung der Spaltung im 0,8%tigen Agarosegel mit pCRBluntyaaU bezeichnet.

[0062] Anschließend wird der Vektor pCRBluntyaaU mit den Enzymen *EcoRI* und *BamHI* gespalten und das *yaaU*-Fragment nach Auftrennung im 0,8%tigem Agarosegel aus dem Gel isoliert (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN, Hilden, Deutschland) und mit dem Vektor pTrc99A (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), der mit den Enzymen *BamHI* und *EcoRI* verdaut worden ist, ligiert. Der *E. coli* Stamm XL1Blue MRF (Stratagene, La Jolla, USA) wird mit dem Ligationsansatz transformiert und Plasmid tragende Zellen auf LB Agar, der mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt ist, selektioniert.

[0063] Die erfolgreiche Klonierung kann nach der Plasmid DNA Isolierung durch die Kontrollspaltung mit den Enzymen *EcoRI/BamHI* und *EcoRV* nachgewiesen werden.

[0064] Das Plasmid wird als pTrc99A_{yaaU} (Fig. 1) bezeichnet.

Beispiel 2

Herstellung von L-Threonin mit dem Stamm MG442/pTrc99A_{yaaU}

[0065] Der L-Threonin produzierende *E. coli* Stamm MG442 ist in der Patentschrift US-A- 4,278,765 beschrieben und bei der Russischen Nationalsammlung für industrielle Mikroorganismen (VKPM, Moskau, Russland)

als CMIM B-1628 hinterlegt.

[0066] Der Stamm MG442 wird mit dem in Beispiel 1 beschriebenen Expressionsplasmid pTrc99A_{yaaU} und mit dem Vektor pTrc99A transformiert und auf LB Agar mit 50 µg/ml Ampicillin Plasmid tragende Zellen selektioniert. Auf diese Weise entstehen die Stämme MG442/pTrc99A_{yaaU} und MG442/pTrc99A. Ausgewählte Einzelkolonien werden anschließend auf Minimalmedium mit der folgenden Zusammensetzung: 3,5 g/l Na₂HPO₄·2H₂O, 1,5 g/l KH₂PO₄, 1 g/l NH₄Cl, 0,1 g/l MgSO₄·7H₂O, 2 g/l Glucose, 20 g/l Agar, 50 mg/l Ampicillin, weiter vermehrt.

[0067] Die Bildung von L-Threonin wird in batch Kulturen von 10 ml, die in 100 ml Erlenmeierkolben enthalten sind, überprüft. Dazu wird 10 ml Vorkulturmedium der folgenden Zusammensetzung: 2 g/l Hefeextrakt, 10 g/l (NH₄)₂SO₄, 1 g/l KH₂PO₄, 0,5 g/l MgSO₄·7H₂O, 15 g/l CaCO₃, 20 g/l Glucose, 50 mg/l Ampicillin, beimpft und für 16 Stunden bei 37°C und 180 rpm auf einem ESR Inkubator der Firma Kühner AG (Birsfelden, Schweiz) inkubiert. Je 250 µl dieser Vorkultur werden in 10 ml Produktionsmedium (25 g/l (NH₄)₂SO₄, 2 g/l KH₂PO₄, 1 g/l MgSO₄·7H₂O, 0,03 g/l FeSO₄·7H₂O, 0,018 g/l MnSO₄·1H₂O, 30 g/l CaCO₃, 20 g/l Glucose, 50 mg/l Ampicillin) überimpft und für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Bildung von L-Threonin durch den Ausgangsstamm MG442 wird in der gleichen Weise überprüft, wobei jedoch keine Zugabe von Ampicillin zum Medium erfolgt. Nach der Inkubation wird die optische Dichte (OD) der Kultursuspension mit einem LP2W-Photometer der Firma Dr. Lange (Düsseldorf, Deutschland) bei einer Messwellenlänge von 660 nm bestimmt.

[0068] Anschließend wird die Konzentration an gebildetem L-Threonin im steril filtrierten Kulturüberstand mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenreaktion mit Ninhydrindetektion bestimmt.

[0069] In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuches dargestellt.

Tabelle 1

Stamm	OD (660 nm)	L-Threonin g/l
MG442	5,6	1,4
MG442/pTrc99A	3	1,3
MG442/pTrc99A _{yaaU}	4,1	2,7

[0070] Kurze Beschreibung der Figur:

[0071] [Fig. 1](#): Karte des das yaaU-Gen enthaltenden Plasmides pTrc99A_{yaaU}

[0072] Längenangaben sind als ca.-Angaben aufzufassen. Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung:

- bla: Gen, welches für die Ampicillinresistenz kodiert
- lac Iq: Gen für das Repressorprotein des trc-Promotors
- trc: trc-Promotorregion, IPTG-induzierbar
- yaaU: Kodierregion des yaaU-Gens
- 5S: 5S rRNA-Region
- rrnBT: rRNA-Terminator-Region

[0073] Die Abkürzungen für die Restriktionsenzyme haben folgende Bedeutung:

- BamHI: Restriktionsendonuklease aus *Bacillus amyloliquefaciens* H
- EcoRI: Restriktionsendonuklease aus *Escherichia coli* RY13
- EcoRV: Restriktionsendonuklease aus *Escherichia coli* B946

**Es folgt ein Sequenzprotokoll nach WIPO St. 25.
Dieses kann von der amtlichen Veröffentlichungsplattform des DPMA heruntergeladen werden.**

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren durch Fermentation von rekombinanten Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, **dadurch gekennzeichnet**, dass man
 - a) die gewünschten L-Aminosäure produzierenden Mikroorganismen, in denen man den yaaU-ORF oder eine für das Genprodukte kodierende Nukleotidsequenz oder Allele verstärkt, insbesondere überexprimiert, in einem Medium kultiviert unter Bedingungen, bei denen die gewünschte L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen angereichert wird, und
 - b) die gewünschte L-Aminosäure isoliert, wobei gegebenenfalls Bestandteile der Fermentationsbrühe und/oder die Biomasse in ihrer Gesamtheit oder Anteilen (≥ 0 bis 100 %) im isolierten Produkt verbleiben oder vollständig entfernt werden.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man rekombinante Mikroorganismen einsetzt, die man durch die Transformation eines Mikroorganismus der Familie Enterobacteriaceae mit einem Vektor erzeugt, wobei der Vektor den yaaU-ORF enthält.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass in den rekombinanten Mikroorganismen die Kopienzahl des Gens/der Gene und/oder ORF um mindestens 1 erhöht vorliegt(en).
4. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Erhöhung der Kopienzahl des yaU-ORF um mindestens 1 durch Integration des Gens in das Chromosom des Mikroorganismus erzielt wird.
5. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Erhöhung der Kopienzahl des yaU-ORF um mindestens 1 durch einen extrachromosomal replizierenden Vektor erzielt wird.
6. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erzielung der Verstärkung
 - a) die Promoter- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle stromaufwärts des yaaU-ORFs mutiert, oder
 - b) Expressionskassetten oder Promotoren stromaufwärts des yaaU-ORFs einbaut.
7. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man einen yaaU-ORF verwendet, der unter der Kontrolle eines Promoters steht.
8. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man durch die Verstärkung des yaU-ORFs die Konzentration oder Aktivität des yaaU-Genproduktes (Proteins) um mindestens 10% erhöht, bezogen auf die Aktivität oder Konzentration des Genproduktes im Ausgangsstamm.
9. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Mikroorganismen ausgewählt aus den Gattungen Escherichia, Erwinia, Providencia und Serratia einsetzt.
10. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Mikroorganismen einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt, insbesondere überexprimiert.
11. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Herstellung von L-Threonin Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae fermentiert, in denen man zusätzlich gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe:
 - 11.1 das für die Aspartatkinase, die Homoserin-Dehydrogenase, die Homoserinkinase und die Threoninsynthase kodierende thrABC-Operon,
 - 11.2 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-Gen,
 - 11.3 das für die Phosphoenolpyruvat-Synthase kodierende pps-Gen,
 - 11.4 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase kodierende ppc-Gen,
 - 11.5 die für die Transhydrogenase kodierenden Gene pntA und pntB,
 - 11.6 das Homoserinresistenz vermittelnde Gen rhtB,
 - 11.7 das Threoninresistenz vermittelnde Gen rhtC,

11.8 das für das Threoninexport-Protein kodierende thrE-Gen,
 11.9 das für die Glutamat-Dehydrogenase kodierende gdhA-Gen,
 11.10 das für die Phosphoglucomutase kodierende pgm-Gen,
 11.11 das für die Fructose Biphosphat Aldolase kodierende fba-Gen,
 11.12 das für die Phosphohistidin-Protein-Hexose-Phosphotransferase kodierende ptsH-Gen,
 11.13 das für das Enzym I des Phosphotransferase-Systems kodierende ptsI-Gen,
 11.14 das für die Glucose-spezifische IIA Komponente kodierende crr-Gen,
 11.15 das für die Glucose-spezifische IIBC Komponente kodierende ptsG-Gen,
 11.16 das für den Regulator des Leucin-Regulons kodierende lrp-Gen,
 11.17 das für den Regulator des fad-Regulons kodierende fadR-Gen,
 11.18 das für den Regulator des zentralen Intermediärstoffwechsels kodierende iclR-Gen,
 11.19 das für die kleine Untereinheit der Alkyl Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpC-Gen,
 11.20 das für die große Untereinheit der Alkyl Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpF-Gen,
 11.21 das für die Cystein-Synthase A kodierende cysK-Gen,
 11.22 das für den Regulator des cys-Regulons kodierende cysB-Gen,
 11.23 das für das Flavoprotein der NADPH-Sulfit-Reduktase kodierende cysJ-Gen,
 11.24 das für das Hämoprotein der NADPH-Sulfit-Reduktase kodierende cysI-Gen,
 11.25 das für die Adenylylsulfat-Reduktase kodierende cysH-Gen,
 11.26 das für ein Membranprotein mit anti-sigmaE-Aktivität kodierende rseA-Gen,
 11.27 das für einen globalen Regulator des sigmaE-Faktors kodierende rseC-Gen
 11.28 das für die Decarboxylase Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucA-Gen,
 11.29 das für die Dihydrolipoyltranssuccinase E2 Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucB-Gen,
 11.30 das für die β -Untereinheit der Succinyl-CoR Synthetase kodierende sucC-Gen,
 11.31 das für die α -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende sucD-Gen,
 11.32 das für die E1-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodierende aceE-Gen,
 11.33 das für die E2-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodierende aceF-Gen und,
 11.34 das für den Regulator der SigmaE-Faktor-Aktivität kodierende rseB-Gen verstärkt, insbesondere über-exprimiert.

12. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Mikroorganismen einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise abgeschwächt sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.

13. Verfahren gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Herstellung von L-Threonin Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae fermentiert, in denen man zusätzlich gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe:

13.1 das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-Gen,
 13.2 das für die Malat-Dehydrogenase kodierende mdh-Gen,
 13.3 das Genprodukt des offenen Leserahmens (ORF) yjfA,
 13.4 das Genprodukt des offenen Leserahmens (ORF) ytfP,
 13.5 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende pckA-Gen,
 13.6 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende poxB-Gen,
 13.7 das für den DgsA-Regulator des Phosphotransferase-Systems kodierende dgsA-Gen,
 13.8 das für den Fructose-Repressor kodierende fruR-Gen,
 13.9 das für den Sigma³⁸-Faktor kodierende rpoS-Gen und,
 13.10 das für die Aspartat Ammonium-Lyase kodierende aspA-Gen
 abschwächt, insbesondere ausschaltet oder die Expression verringert.

14. Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, insbesondere der Gattung Escherichia, in denen der yaaU-ORF oder für dessen Genprodukt kodierende Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere über-exprimiert, vorliegen.

15. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 und 12, dadurch gekennzeichnet, dass man L-Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin herstellt.

16. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 10 und 12, dadurch gekennzeichnet, dass man L-Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Isoleucin, L-Valin, L-Methionin, L-Homoserin und L-Lysin herstellt.

17. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass man L-Threonin herstellt.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Abb. 1: Karte des Plasmides pTrc99AyaaU

