



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2005 020 538 A1** 2006.11.23

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2005 020 538.0**

(22) Anmeldetag: **03.05.2005**

(43) Offenlegungstag: **23.11.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 1/00** (2006.01)

(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 Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von verbesserten 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 yjcG-ORF, für das Genprodukt 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 Anteile (≥ 0 bis 100%) im isolierten Produkt verbleiben oder vollständig entfernt werden.

Beschreibung

[0001] Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, unter Verwendung von rekombinanten Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen der offene Leserahmen (ORF) mit der Bezeichnung *yjcG* verstärkt, insbesondere überexprimiert wird, und diese Mikroorganismen.

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* und *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology, 2nd edition, ASM Press, Washington, D.C., USA, (1996) zu finden.

Aufgabenstellung

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 sind rekombinante Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, die einen verstärkten oder überexprimierten offenen Leserahmen *yjcG*, der für ein Polypeptid kodiert, welches als Acetat Permease annotiert ist, oder für dessen Genprodukt kodierende Nukleotidsequenzen enthalten, und die eine verbesserte Fähigkeit zur Bildung und Anreicherung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, zeigen.

[0008] Als Ausgangspunkt für den Vergleich dienen jeweils die für den *yjcG*-ORF nicht rekombinanten Mikroorganismen, die keinen verstärkten *yjcG*-ORF enthalten und an denen die Maßnahmen der Erfindung durchgeführt werden.

[0009] Zu diesen Mikroorganismen gehören insbesondere Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen ein Polynukleotid verstärkt wird, das für ein Polypeptid kodiert, dessen Aminosäuresequenz zu mindestens 90%, insbesondere zu mindestens 95%, bevorzugt zu mindestens 98% oder mindestens 99%, besonders bevorzugt zu 99,8 und ganz besonders bevorzugt zu 100 identisch ist mit einer Aminosäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4 und SEQ ID No. 6.

[0010] Die genannten Mikroorganismen enthalten verstärkte oder überexprimierte Polynukleotide, ausgewählt aus der Gruppe:

- Polynukleotid mit einer Nukleotidsequenz, ausgewählt aus SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3 oder SEQ ID No. 5 und den dazu komplementären Nukleotidsequenzen;
- Polynukleotid mit einer Nukleotidsequenz, die der SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3 oder SEQ ID No. 5 im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entspricht;
- Polynukleotidsequenz mit einer Sequenz, die mit der zur Sequenz SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3 oder SEQ ID No. 5 komplementären Sequenz unter stringenten Bedingungen hybridisiert, wobei die stringenten Bedingungen bevorzugt durch einen Waschschritt erreicht werden, in dem sich die Temperatur über einen Bereich von 64°C bis 68°C und die Salzkonzentration des Puffers über einen Bereich von $2 \times \text{SSC}$ bis $0,1 \times \text{SSC}$ erstrecken;
- Polynukleotid mit einer Sequenz SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3 oder SEQ ID No. 5, die funktionsneutrale Sinnmutanten enthält,

wobei die Polynukleotide für eine Acetat Permease kodieren.

[0011] Gegenstand der Erfindung ist ebenso ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, unter Verwendung von rekombinanten Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, die insbesondere bereits L-Aminosäuren produzieren, und in denen mindestens der offene Leserahmen (ORF) mit der Bezeichnung *yjcG* oder für dessen Genprodukt kodierende Nukleotidsequenzen verstärkt wird bzw. werden.

[0012] Bevorzugt werden die beschriebenen Mikroorganismen eingesetzt.

[0013] 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-Prolin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan, L-Arginin und L-Homoserin gemeint. Besonders bevorzugt ist L-Threonin.

[0014] 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 funktionell mit dem Gen verknüpft 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.

[0015] 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.

[0016] 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.

[0017] 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 auf die Aktivität oder Konzentration des Proteins im für das entsprechende Enzym bzw. Protein nicht rekombinanten Mikroorganismus oder Elternstamm erhöht. Als nicht rekombinanter Mikroorganismus oder Elternstamm (parent strain) wird der Mikroorganismus verstanden, an dem die erfinderischen Maßnahmen durchgeführt werden.

[0018] 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 die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Mikroorganismen, in denen man den offenen Leserahmen *yjcG* oder für das Genprodukt 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.

[0019] Die insbesondere rekombinanten Mikroorganismen mit einem verstärkten oder überexprimierten offenen Leserahmen (ORF) mit der Bezeichnung *yjcG*, die ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Laktose, 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.

[0020] Rekombinante Mikroorganismen werden im Allgemeinen durch Transformation, Transduktion oder Konjugation, oder einer Kombination dieser Methoden, mit einem Vektor erzeugt, der den gewünschten ORF, das gewünschte Gen, ein Allel dieses ORFs oder Gens oder Teile davon und/oder einen die Expressierung des ORFs oder Gens verstärkenden Promotor enthält. Bei diesem Promotor kann es sich um den durch verstärkende Mutation aus der eigenen, upstream des Gens oder ORFs befindlichen regulatorischen Sequenz hervorgegangenen Promotor handeln, oder es wurde ein effizienter Promotor mit dem Gen oder ORF fusioniert.

[0021] Als Elternstamm geeignete, insbesondere L-Threonin produzierende Stämme der Gattung

Escherichia, insbesondere der Art *Escherichia coli* sind beispielsweise zu nennen:

- *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)

[0022] Als Elternstamm geeignete L-Threonin produzierende Stämme der Gattung *Serratia*, insbesondere der Art *Serratia marcescens* sind beispielsweise zu nennen:

- *Serratia marcescens* HNr21 (Applied and Environmental Microbiology 38(6): 1045-1051 (1979))
- *Serratia marcescens* TLr156 (Gene 57(2-3): 151-158 (1987))
- *Serratia marcescens* T-2000 (Applied Biochemistry and Biotechnology 37(3): 255-265 (1992))

[0023] 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 Diaminobornsteinsäure, 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.

[0024] Es wurde gefunden, dass Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae nach Überexpression des Gens oder offenen Leserahmens (ORF) *yjcG*, oder dessen Allelen, eine verbesserte Fähigkeit zur Bildung und Anreicherung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, zeigen.

[0025] 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. Es ist bekannt, dass durch wirtseigene Enzyme (Methionin-Aminopeptidase) die N-terminale Aminosäure Methionin abgespalten werden kann.

[0026] Aus den ebenfalls zur Familie Enterobacteriaceae gehörenden *Salmonella typhimurium* (Accession No.: NC_003197 (Region 4511508-4513157)) und *Shigella flexneri* (Accession No.: NC_004337 (Region 4293843-4295492)) ist die Nukleotidsequenz für den *yjcG*-ORF ebenso bekannt.

[0027] Der *yjcG*-ORF von *Escherichia coli* K12 wird unter anderem durch folgende Angaben beschrieben:

Gimenez et al. (Journal of Microbiology 185(21): 6448-55 (2003)) beschreiben den offenen Leserahmen *yjcG* aus *Escherichia coli* kodierend für ein Protein mit der Funktion einer Acetat Permease aus der Solute: Sodium Symporter (SSS) Familie und schlagen den Gennamen *actP* vor; das Gen wird kotranskribiert mit *acs*, welches für eine Acetyl Coenzym A Synthetase kodiert; die Permease ist hoch spezifisch für kurzkettigen aliphatische Monocarboxylate und transportiert neben Acetat auch Glycolat in zum Wachstum ausreichender Menge sowie kleine Carboxylate, wie z.B. Propionat.

Accession No.: N0000913 (Region 4281276-4282925)

Alternativer Genname: b4067, *actP*

[0028] 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, Mis-

hima, Japan) entnommen werden.

[0029] Der besseren Übersichtlichkeit halber sind die bekannte Sequenz zum *yjcG*-ORF von *Escherichia coli* unter der SEQ ID No. 1 und die bekannten Sequenzen zum *yjcG*-ORF von *Salmonella typhimurium* bzw. *Shigella flexneri* unter der SEQ ID No. 3 bzw. SEQ ID No. 5 dargestellt. Die von diesen Leserahmen kodierten Proteine sind als SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4 und SEQ ID No. 6 dargestellt.

[0030] Die in den angegebenen Textstellen beschriebenen offenen Leserahmen können erfindungsgemäß verwendet werden. 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.

[0031] Unter „endogenen Genen“ oder „endogenen Nukleotidsequenzen“ versteht man die in der Population einer Art vorhandenen Gene oder offene Leserahmen oder Allele beziehungsweise Nukleotidsequenzen.

[0032] Zu den Allelen des *yjcG*-ORFs, welche funktionsneutrale Sinnmutationen enthalten, zählen unter anderem solche, die zu höchstens 60 oder zu höchstens 50 oder zu höchstens 40 oder zu höchstens 30 oder zu höchstens 20, bevorzugt zu höchstens 10 oder zu höchstens 5, ganz besonders bevorzugt zu höchstens 3 oder zu höchstens 2 oder zu mindestens einem konservativen Aminosäureaustausch in dem von ihnen kodierten Protein führen.

[0033] 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 gegeneinander ausgetauscht werden. Bei den basischen Aminosäuren spricht man von konservativen Austauschen wenn Arginin, Lysin und Histidin gegeneinander ausgetauscht werden. Bei den sauren Aminosäuren spricht man von konservativen Austauschen wenn Asparaginsäure und Glutaminsäure gegeneinander ausgetauscht werden. Bei den Hydroxyl-Gruppen enthaltenden Aminosäuren spricht man von konservativen Austauschen wenn Serin und Threonin gegeneinander ausgetauscht werden.

[0034] 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 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 3 oder 2 Aminosäuren oder Aminosäurereste.

[0035] 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.

[0036] Zu den geeigneten Allelen gehören ferner solche die durch Hybridisierung, insbesondere unter stringenten Bedingungen unter Verwendung von SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3 oder SEQ ID No. 5 oder Teilen davon insbesondere der Kodierregionen bzw. der dazu komplementären Sequenzen, erhältlich sind.

[0037] 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 80% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschriffe 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 Waschschriffen durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

[0038] Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein Puffer entsprechend $5 \times$ SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50°C – 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 80% 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 $2 \times$ SSC und gegebenenfalls nachfolgend $0,5 \times$ 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 , ca. 52°C – 68°C , ca. 54°C – 68°C , ca. 56°C – 68°C , ca. 58°C – 68°C , ca. 60°C – 68°C , ca. 62°C – 68°C , ca. 64°C – 68°C , ca. 66°C – 68°C eingestellt wird. Temperaturbereiche von ca. 64°C – 68°C oder ca. 66°C – 68°C werden bevorzugt. Es ist gege-

benenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf eine Konzentration entsprechend $0,2 \times \text{SSC}$ oder $0,1 \times \text{SSC}$ zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. $1\text{--}2^\circ\text{C}$ von 50°C auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 80% oder mindestens 90%, mindestens 91%, mindestens 92%, mindestens 93%, mindestens 94%, mindestens 95%, mindestens 96%, mindestens 97%, mindestens 98% oder mindestens 99% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde bzw. zu den in SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3 oder SEQ ID No. 5 dargestellten Nukleotidsequenzen 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).

[0039] 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.

[0040] 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, des weiteren vorteilhaft sein kann auch die Verwendung von Promotoren zur Genexpression, die eine andere zeitliche Genexpression ermöglicht. Auf der Ebene der translationalen Regulation der Genexpression ist es möglich, die Häufigkeit der Initiation (Anlagerung des Ribosoms an die m-RNA) oder die Geschwindigkeit der Elongation (Verlängerungsphase) zu erhöhen. 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 ORFs, 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.

[0041] Methoden der Überexpression sind im Stand der Technik hinlänglich – beispielsweise bei Makrides et al. (*Microbiological Reviews* 60 (3), 512-538 (1996)) – beschrieben. Durch Verwendung von Vektoren wird die Kopienzahl um mindestens eine (1) Ko-

pie erhöht. Als Vektoren können Plasmide wie beispielsweise in der US 5,538,873 beschrieben verwendet werden. Als Vektoren können ebenfalls Phagen, beispielsweise der Phage Mu, wie in der EP 0332448 beschrieben, oder der Phage lambda (λ) verwendet werden. Eine Erhöhung der Kopienzahl kann auch dadurch erzielt werden, dass eine weitere Kopie in eine weitere Stelle des Chromosoms – beispielsweise in die att-site des Phagen λ (Yu und Court, *Gene* 223, 77-81 (1998)) – eingebaut wird. In der US 5,939,307 wird beschrieben, dass durch Einbau von Expressionskassetten oder Promotoren wie beispielsweise tac-Promotor, trp-Promotor, lpp-Promotor oder P_L -Promotor und P_R -Promotor des Phagen λ beispielsweise stromaufwärts des chromosomalen Threoninoperons eine Erhöhung der Expression erzielt werden konnte. In gleicher Weise können die Promotoren des Phagen T7, die gear-box-Promotoren oder der nar-Promotor verwendet werden. Derartige Expressionskassetten oder Promotoren können auch verwendet werden um, wie in der EP 0 593 792 beschrieben, plasmidgebundene Gene zu überexprimieren. Durch Verwendung des lacI^Q -Allels lässt sich wiederum die Expression plasmidgebundener Gene kontrollieren (Glascock und Weickert, *Gene* 223, 221-231 (1998)). Es ist weiterhin möglich, dass die Aktivität der Promotoren durch Modifikation ihrer Sequenz mittels einem oder mehreren Nukleotid austauschen, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) erhöht ist. Eine andere zeitliche Genexpression kann beispielsweise wie bei Walker et al. (*Journal of Bacteriology* 181: 1269-80 (1999)) beschrieben durch die Verwendung des Wachstumsphasen-abhängigen fis Promotors erreicht werden. Die Geschwindigkeit der Elongation wird durch die Codon-Verwendung beeinflusst, durch den Gebrauch von Codons für im Elternstamm (parent strain) häufig vorkommenden t-RNAs kann die Genexpression verstärkt werden.

[0042] Allgemeine 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.

[0043] 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 den *yjcG*-ORF, oder für dessen Genprodukt kodierende Nukleotidsequenzen oder Allele trägt.

[0044] Unter dem Begriff Transformation versteht man die Aufnahme einer isolierten Nukleinsäure durch einen Wirt (Mikroorganismus).

[0045] 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.

[0046] 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).

[0047] 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 *yjcG*, 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.

[0048] So können beispielsweise gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- mindestens ein Gen des für die Aspartatkinase, die Homoserin-Dehydrogenase, die Homoserinkinase und die Threoninsynthase kodierenden *thrABC*-Operons (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); WO 97/08333),
- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase kodierende *ppc*-Gen (WO 02/064808),

- die für die Untereinheiten der Transhydrogenase kodierenden Gene *pntA* und *pntB* (European Journal of Biochemistry 158: 647-653 (1986); WO 95/11985),
- das für das Threoninresistenz vermittelnde Protein kodierende Gen *rhtC* (EP-A-1 013 765),
- das für das Threonin-Export-Carrier-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); DE19907347),
- 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 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 *cysJIH*-Operons (WO 03/006666),
- das für die Adenylylsulfat-Reduktase kodierende *cysH*-Gen des *cysJIH*-Operons (WO 03/006666),
- 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 *sucABCD*-Operons (WO 03/008615),
- das für die α -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende *sucD*-Gen des *sucABCD*-Operons (WO 03/008615),
- das Genprodukt des offenen Leserahmens (ORF) *yibD* von *Escherichia coli* (Accession Number AE000439 des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA), DE102004005836.9), und
- das für die Acetyl Coenzym A Synthetase kodierende Gen *acs* (Journal of Bacteriology 177(10): 2878-86 (1995))

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

[0049] Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des offenen Leserahmens yjcG, 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 von Escherichia coli (Accession Number AAC77180 des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA), WO 02/29080),
- das Genprodukt des offenen Leserahmens (ORF) ytfP von Escherichia coli (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 02/36797),
- 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.

[0050] 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 schwächeren Promotor als im für das entsprechende Enzym bzw. Protein nicht rekombinanten Mikroorganismus oder Elternstamm 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.

[0051] Durch die Maßnahmen der Abschwächung wird die Aktivität oder Konzentration des entspre-

chenden 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 für das entsprechende Enzym bzw. Protein nicht rekombinanten Mikroorganismus oder Elternstamm, herabgesenkt. Als nicht rekombinanter Mikroorganismus oder Elternstamm (parent strain) wird der Mikroorganismus verstanden, an dem die erfinderischen Maßnahmen durchgeführt werden.

[0052] Zur Erzielung einer Abschwächung können beispielsweise die Expression der Gene oder offenen Leserahmen oder die katalytischen Eigenschaften der Enzymproteine herabgesetzt bzw. ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.

[0053] Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung, durch genetische Veränderung (Mutation) der Signalstrukturen der Genexpression oder auch durch Antisense-RNA Technik erfolgen. Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem beispielsweise bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191-195 (1998)), bei Carrier und Keasling (Biotechnology Progress 15: 58-64 (1999)), Franch und Gerdes (Current Opinion in Microbiology 3: 159-164 (2000)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie beispielsweise dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990).

[0054] Mutationen, die zu einer Veränderung beziehungsweise Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind aus dem Stand der Technik bekannt. Als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Yano et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95: 5511-5515 (1998)), Wente und Schachmann (Journal of Biological Chemistry 266: 20833-20839 (1991)) genannt. Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

[0055] Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen von mindestens einem (1) Basenpaar bzw. Nukleotid in Betracht. In Abhängigkeit von der Wirkung des durch die Mutation hervorgerufenen Aminosäureaustausches auf

die Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen („missense mutations“) oder Nichtsinnmutationen („nonsense mutations“) gesprochen. Die Fehlsinnmutation führt zu einem Austausch einer gegebenen Aminosäure in einem Protein gegen eine andere, wobei es sich insbesondere um einen nicht-konservative Aminosäureaustausch handelt. Hierdurch wird die Funktionsfähigkeit bzw. Aktivität des Proteins beeinträchtigt und auf einen Wert von 0 bis 75%, 0 bis 50%, 0 bis 25%, 0 bis 10% oder 0 bis 5% reduziert. Die Nichtsinnmutation führt zu einem Stop-Kodon im Kodierbereich des Gens und damit zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation. Insertionen oder Deletionen von mindestens einem Basenpaar in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen („frame shift mutations“), die dazu führen, dass falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Entsteht als Folge der Mutation ein Stop-Kodon im Kodierbereich, so führt dies ebenfalls zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation.

[0056] Deletionen von mindestens einem (1) oder mehreren Kodonen führen typischerweise ebenfalls zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität.

[0057] Anleitungen zur Erzeugung derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

[0058] Geeignete Mutationen in den Genen können durch Gen- bzw. Allelaustausch in geeignete Stämme eingebaut werden.

[0059] Eine gebräuchliche Methode ist die von Hamilton et al. (Journal of Bacteriology 171: 4617-4622 (1989)) beschriebene Methode des Genaustauschs mit Hilfe eines konditional replizierenden pSC101-Derivates pMAK705. Andere im Stand der Technik beschriebene Methoden wie beispielsweise die von Martinez-Morales et al. (Journal of Bacteriology 181: 7143-7148 (1999)) oder die von Boyd et al. (Journal of Bacteriology 182: 842-847 (2000)) können gleichfalls benutzt werden.

[0060] Es ist ebenfalls möglich, Mutationen in den jeweiligen Genen oder Mutationen, die die Expression der jeweiligen Gene oder offenen Leserahmen betreffen, durch Konjugation oder Transduktion in verschiedene Stämme zu überführen.

[0061] Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des offenen Leserahmens yjcG, unerwünschte Nebenreaktionen aus-

zuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

[0062] Die Leistung der isolierten Bakterien bzw. des Fermentationsprozesses unter Verwendung derselben bezüglich eines oder mehrerer der Parameter ausgewählt aus der Gruppe der Produkt-Konzentration (Produkt pro Volumen), der Produkt-Ausbeute (gebildetes Produkt pro verbrauchter Kohlenstoff-Quelle) und der Produkt-Bildung (gebildetes Produkt pro Volumen und Zeit) oder auch anderer Prozess-Parameter und Kombinationen davon, wird um mindestens 0,5%, mindestens 1%, mindestens 1,5% oder mindestens 2% bezogen auf den nicht rekombinanten Mikroorganismus oder Elternstamm bzw. den Fermentationsprozess unter Verwendung desselben verbessert.

[0063] Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können im batch – Verfahren (Satzkultivierung), im fed batch (Zulaufverfahren), im repeated fed batch-Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) oder in einem kontinuierlichen Verfahren (DE102004028859.3 oder US5,763,230) kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 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.

[0064] Das zu verwendende Kulturmedium muss in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. 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.

[0065] Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Laktose, 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.

[0066] 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 Am-

moniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

[0067] 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.

[0068] 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 Gas-mischungen 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.

[0069] Aus der entnommenen Kulturbrühe können die L-Aminosäuren gewonnen, gesammelt oder konzentriert und gegebenenfalls gereinigt werden.

[0070] Es ist ebenfalls möglich aus der entnommenen Kulturbrühe (= Fermentationsbrühe) ein Produkt herzustellen, indem man die in der Kulturbrühe enthaltene Biomasse des Bakteriums vollständig (100) oder nahezu vollständig d.h. mehr als oder größer als (>) 90% entfernt und die übrigen Bestandteile der Fermentationsbrühe weitgehend d.h. zu 30%–100%, bevorzugt größer gleich (\geq) 50%, \geq 70% oder \geq 90% oder auch vollständig (100) im Produkt belässt.

[0071] Zur Entfernung oder Abtrennung der Biomasse werden Separationsmethoden wie beispielsweise Zentrifugation, Filtration, Dekantieren, Flockung oder eine Kombination hieraus eingesetzt.

[0072] Die erhaltene Brühe wird anschließend mit bekannten Methoden wie beispielsweise mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnschichtverdampfers, Fallfilmverdampfers, durch Umkehrosmose, durch Nanofiltration oder einer Kombination hieraus eingedickt beziehungsweise konzentriert.

[0073] Diese aufkonzentrierte Brühe wird anschließend durch Methoden der Gefriertrocknung, der Sprühtrocknung, der Sprühgranulation oder durch anderweitige Verfahren zu einem vorzugsweise rieselfähigen, feinteiligen Pulver aufgearbeitet. Dieses rieselfähige, feinteilige Pulver kann dann wiederum durch geeignete Kompaktier- oder Granulier-Verfahren in ein grobkörniges, gut rieselfähiges, lagerbares und weitgehend staubfreies Produkt überführt werden. Das Wasser wird hierbei insgesamt zu mehr als 90% entfernt, sodass der Wassergehalt im Produkt kleiner als 10%, kleiner als 5% beträgt.

[0074] 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.

[0075] Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, wie beispielsweise L-Threonin, L-Isoleucin, L-Valin, L-Methionin, L-Homoserin, L-Tryptophan und L-Lysin, insbesondere L-Threonin.

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

Patentansprüche

1. Rekombinante Mikroorganismen, die einen verstärkten oder überexprimierten *ycG*-ORF enthalten, dessen Genprodukt die Aktivität der Acetat Permease aufweist.

2. Mikroorganismen gemäß Anspruch 1, in denen ein dem *ycG*-ORF entsprechendes Polynukleotid verstärkt wird, das für ein Polypeptid kodiert, dessen Aminosäuresequenz zu mindestens 90% identisch ist mit einer Aminosäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4 und SEQ ID No. 6, wobei das Polypeptid die Aktivität der Acetat Permease aufweist.

3. Mikroorganismen gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass sie ein dem *ycG*-ORF entsprechendes überexprimiertes oder verstärktes

Polynukleotid enthalten ausgewählt aus der Gruppe:

- a) Polynukleotid mit einer Nukleotidsequenz, ausgewählt aus SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3 oder SEQ ID No. 5 und den dazu komplementären Nukleotidsequenzen;
- b) Polynukleotid mit einer Nukleotidsequenz, die der SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3 oder SEQ ID No. 5 im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entspricht;
- c) Polynukleotidsequenz mit einer Sequenz, die mit der zur Sequenz SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3 oder SEQ ID No. 5 komplementären Sequenz unter stringenten Bedingungen hybridisiert, wobei die stringenten Bedingungen durch einen Waschschrift erreicht werden, in dem sich die Temperatur über einen Bereich von 64°C bis 68°C und die Salzkonzentration des Puffers über einen Bereich von $2 \times \text{SSC}$ bis $0,1 \times \text{SSC}$ erstrecken;
- d) Polynukleotid mit einer Sequenz SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3 oder SEQ ID No. 5, die funktionsneutrale Sinnmutanten enthält.

4. Mikroorganismen gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid eine Aminosäuresequenz besitzt, die zu wenigstens 95% identisch ist mit einer der Sequenzen ausgewählt aus der Gruppe SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4 und SEQ ID No. 6.

5. Mikroorganismen gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid die Aminosäuresequenz aufweist, die 100% identisch ist mit einer der Sequenzen, ausgewählt aus der Gruppe SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4 oder SEQ ID No. 6.

6. Mikroorganismus gemäß den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass sie durch Transformation, Transduktion, Konjugation oder eine Kombination dieser Methoden hergestellt werden, mit einem Vektor, der den yjcG-ORF, ein Allel dieses ORFs oder Teile davon und/oder einen Promotor enthält.

7. Mikroorganismen gemäß den Ansprüchen 1 bis 6, in denen die Kopienzahl des yjcG-ORFs oder der Allele um mindestens 1 erhöht vorliegt.

8. Mikroorganismen gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Erhöhung der Kopienzahl des yjcG-ORFs um mindestens 1 durch Integration des ORFs oder der Allele in das Chromosom der Mikroorganismen bewirkt wird.

9. Mikroorganismen gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Erhöhung der Kopienzahl des yjcG-ORFs um mindestens 1 durch einen extrachromosomal replizierenden Vektor erzielt wird.

10. Mikroorganismen gemäß den Ansprüchen 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erzielung der Verstärkung

- a) die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle stromaufwärts des yjcG-ORFs mutiert, oder
- b) Expressionskassetten oder Promotoren stromaufwärts des yjcG-ORFs einbaut.

11. Mikroorganismen gemäß den Ansprüchen 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Expression des yjcG-ORFs unter der Kontrolle eines die Expression des ORFs verstärkenden Promotors steht.

12. Mikroorganismen gemäß den Ansprüchen 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass durch die Verstärkung des yjcG-ORFs die Konzentration oder Aktivität des yjcG-Genproduktes (Proteins) um mindestens 10% erhöht sind, bezogen auf die Aktivität oder Konzentration des Genproduktes im für den yjcG-ORF nicht rekombinanten Mikroorganismus oder Elternstamm.

13. Mikroorganismen gemäß den Ansprüchen 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Mikroorganismen aus den Gattungen *Escherichia*, *Erwinia*, *Providencia* und *Serratia* ausgewählt sind.

14. Mikroorganismen gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt, insbesondere überexprimiert vorliegen.

15. Mikroorganismen gemäß den Ansprüchen 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass sie L-Threonin produzieren.

16. Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren durch Fermentation von rekombinanten Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, dadurch gekennzeichnet, dass man

- a) die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Mikroorganismen gemäß den Ansprüchen 1 bis 15 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 Bestandteile der Fermentationsbrühe und/oder die Biomasse in ihrer Gesamtheit oder Anteilen (≥ 0 bis 100%) im isolierten Produkt verbleiben oder vollständig entfernt werden.

17. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Herstellung von L-Threonin Mikroorganismen fermentiert, in denen man zusätzlich gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe:

- a) mindestens ein Gen des für die Aspartatkinase, die Homoserin-Dehydrogenase, die Homoserinkinase und die Threoninsynthase kodierenden thrABC-Operons,
- b) das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende

pyc-Gen von *Corynebacterium glutamicum*,
 c) das für die Phosphoenolpyruvat-Synthase kodierende pps-Gen,
 d) das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase kodierende ppc-Gen,
 e) die für die Untereinheiten der Pyridin-Transhydrogenase kodierenden Gene pntA und pntB,
 f) das für das Threoninresistenz vermittelnde Protein kodierende Gen rhtC,
 g) das für das Threonin-Export-Carrier-Protein kodierende thrE-Gen aus *Corynebacterium glutamicum*,
 h) das für die Glutamat-Dehydrogenase kodierende gdhA-Gen,
 i) das für die Phosphohistidin-Protein-Hexose-Phosphotransferase kodierende ptsH-Gen,
 j) das für das Enzym I des Phosphotransferase-Systems kodierende ptsI-Gen,
 k) das für die Glucose-spezifische IIA Komponente kodierende crr-Gen,
 l) das für die Glucose-spezifische IIBC Komponente kodierende ptsG-Gen,
 m) das für die Cystein-Synthase A kodierende cystK-Gen,
 n) das für den Regulator des cys-Regulons kodierende cysB-Gen,
 o) das für das Flavoprotein der NADPH-Sulfit-Reduktase kodierende cysJ-Gen,
 p) das für das Hämoprotein der NADPH-Sulfit-Reduktase kodierende cysI-Gen,
 q) das für die Adenylylsulfat-Reduktase kodierende cysH-Gen,
 r) das für die Decarboxylase Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucA-Gen,
 s) das für die Dihydrolipoyltranssuccinase E2 Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucB-Gen,
 t) das für die β -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende sucC-Gen,
 u) das für die α -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende sucD-Gen,
 v) das Genprodukt des offenen Leserahmens (ORF) yibD von *Escherichia coli*, und
 w) das für die Acetyl Coenzym A Synthetase kodierende acs verstärkt, insbesondere überexprimiert.

18. Verfahren gemäss den Ansprüchen 16 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass man Mikroorganismen einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise abgeschwächt sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.

19. Verfahren gemäss Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Herstellung von L-Threonin Mikroorganismen fermentiert, in denen man zusätzlich gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe:

a) das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-Gen,
 b) das für die Malat-Dehydrogenase kodierende

mdh-Gen,
 c) das Genprodukt des offenen Leserahmens (ORF) yjfA von *Escherichia coli*,
 d) das Genprodukt des offenen Leserahmens (ORF) ytfP von *Escherichia coli*,
 e) das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende pckA-Gen,
 f) das für die Pyruvat-Oxidase kodierende poxB-Gen,
 g) das für den DgsA-Regulator des Phosphotransferase-Systems kodierende dgsA-Gen,
 h) das für den Fructose-Repressor kodierende fruR-Gen,
 i) das für den Sigma³⁸-Faktor kodierende rpoS-Gen, und
 j) das für die Aspartat Ammonium-Lyase kodierende aspA-Gen abschwächt, insbesondere ausschaltet oder die Expression verringert.

20. Verfahren gemäss den Ansprüchen 16 und 18, 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-Prolin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan, L-Arginin und L-Homoserin herstellt.

21. Verfahren gemäss den Ansprüchen 16 und 18, dadurch gekennzeichnet, dass man L-Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Isoleucin, L-Valin, L-Methionin, L-Homoserin, L-Tryptophan und L-Lysin herstellt.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen