



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 60 2004 010 896 T2 2008.12.11**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 608 764 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **60 2004 010 896.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP2004/002796**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **04 721 481.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2004/087937**

(86) PCT-Anmeldetag: **18.03.2004**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **14.10.2004**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.12.2005**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **26.12.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **11.12.2008**

(51) Int Cl.⁸: **C12P 13/08 (2006.01)**

C12R 1/19 (2006.01)

C12R 1/425 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

10314618 01.04.2003 DE

(73) Patentinhaber:

Evonik Degussa GmbH, 40474 Düsseldorf, DE

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI,
SK, TR**

(72) Erfinder:

RIEPING, Mechthild, 33619 Bielefeld, DE

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON L-AMINOSÄUREN UNTER VERWENDUNG VON STÄMMEN DER ENTEROBACTERIACEAE FAMILIE WELCHE DAS GALP GEN, DAS FÜR EIN GALAKTOSE-PROTON-SYMPORTER KODIERT, ÜBEREXPRIMIEREN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von L-Valin, L-Homoserin, L-Lysin und L-Threonin unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae, in denen das galP-Gen überexprimiert 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 können. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung des Herstellverfahrens 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 einiger Zeit 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, (1995) zu finden.

[0006] Aus Venter, Henrietta et al. (Biochemical Journal, Bd. 363, Nr. 2, 15. April 2002 (2002-04-15), Seiten 243–252, XP002288523 ISSN: 0264-6021) ist die Überexpression des galP-Gens (D-Galactose-H⁺-Symportprotein) in E. coli bekannt. Die Überexpression des für das D-Galactose-H⁺-Symportprotein in E. coli kodierenden galP-Gens ist auch aus Walmsley Adrian R. et al. (Journal of Biological Chemistry, Bd. 269, Nr. 25, 1994, Seiten 17 009–17 019, XP002288524, ISSN: 0021-9258) bekannt.

[0007] Aus der EP-A-1 149 911 ist die fermentative Herstellung von L-Threonin bekannt, womit Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, insbesondere E. coli, verwendet werden, die Saccharose-PTS- oder nicht-PTS-Gene für den Saccharosetransport exprimieren. Insbesondere handelt es sich bei einem dieser Gene um die Permease vom lacY-Typ, Protonentransportsystem. Der Gegenstand der Ansprüche unterscheidet sich dahingehend, daß es sich in der vorliegenden Beschreibung bei dem Gen, das in einem Mikroorganismus der Familie Enterobacteriaceae überexprimiert wird, um das galP-Gen handelt.

[0008] Von Martin Giles et al. (Journal of Biological Chemistry, Bd. 269, Nr. 40, 1994, Seiten 24 870–24 877, XP002288526 ISSN: 0021-9258) konnte gezeigt werden, daß es sich bei Forskolin um einen bemerkenswert spezifischen Inhibitor des aktiven D-Galactosetransports durch das GalP-Zucker-H⁺-Symport-Protein aus Escherichia coli handelt. Aus der WO 2004/033 471 (später veröffentlicht) ist ein Verfahren zur Wiederherstellung eines Glu⁺-Phänotyps bei einer PTS⁻/Glu⁻-Bakterienzelle, die ursprünglich dazu in der Lage war, ein Phosphotransferase-Transportsystem (PTS) für den Kohlenhydrattransport zu nutzen, bekannt.

Aufgabenstellung

[0009] Die Erfinder haben sich die Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, bereitzustellen.

Zusammenfassung der Erfindung

[0010] Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Valin, L-Homoserin, L-Lysin und L-Threonin unter Verwendung von Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, die insbesondere bereits L-Aminosäuren produzieren und in denen die für das galP-Gen kodierende Nukleotidsequenz überexprimiert wird.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0011] Das vom galP-Gen kodierte Genprodukt wird im Stand der Technik unter anderem als "Galaktose-Proton-Symporter" oder "Galaktose-Permease" bezeichnet.

[0012] Allgemein wird das von einer Nukleotidsequenz, d. h. einem Gen oder einem Allel kodierte Protein bzw. die kodierte Ribonukleinsäure als Genprodukt bezeichnet.

[0013] Unter Allelen versteht man im Allgemeinen alternative Formen eines gegebenen Gens. Dabei sind die Formen durch Unterschiede in der Nukleotidsequenz gekennzeichnet.

[0014] Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Threonin, L-Valin und Homoserin gemeint. Besonders bevorzugt ist L-Threonin.

[0015] Der Begriff "Überexpression" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität oder Konzentration eines oder mehrerer Enzyme bzw. Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene um mindestens eine (1) Kopie erhöht oder einen starken Promotor verwendet und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

[0016] Durch die Maßnahmen der 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 das Wildtyp-Protein oder die Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus erhöht. Unter dem Ausgangs-Mikroorganismus bzw. Elternstamm versteht man den Mikroorganismus, an dem die erfindungsgemäßen Maßnahmen durchgeführt werden.

[0017] 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 oben genannten L-Aminosäuren produzierenden Mikroorganismen, in denen das galP-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen überexprimiert werden, in einem Medium kultiviert unter Bedingungen, bei denen die genannte L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen angereichert wird, und
- b) die genannte L-Aminosäure isoliert, wobei ≥ 0 bis 100% der Biomasse im isolierten Produkt verbleiben.

[0018] Die, insbesondere rekombinanten, Mikroorganismen, 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.

[0019] Rekombinante Mikroorganismen werden allgemein über Transformation, Transduktion oder Konjugation unter Verwendung eines das gewünschte Gen enthaltenden Vektors hergestellt.

[0020] Geeignete, insbesondere L-Threonin produzierende Stämme der Gattung Escherichia, insbesondere der Art Escherichia coli sind beispielsweise

- Escherichia coli H4581 (EP-A 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)

[0021] Geeignete, insbesondere 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 TLR156 (Gene 57(2-3): 151–158 (1987))
- Serratia marcescens T-2000 (Applied Biochemistry and Biotechnology 37(3): 255–265 (1992))

[0022] 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 Threoninhaltinger 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 Fluorpyruvat, defekte Threonin-Dehydrogenase, gegebenenfalls Fähigkeit zur Saccharose-Verwertung, Überexpression des Threonin-Operons, Überexpression der Homoserin-Dehydrogenase I-Aspartatkinase I, bevorzugt der feed back resistenten Form, Überexpression der Homoserinkinase, Überexpression der Threoninsynthase, Überexpression der Aspartatkinase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form, Überexpression der Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase, Überexpression der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form, Überexpression der Phosphoenolpyruvat-Synthase, Überexpression der Transhydrogenase, Überexpression des RhtB-Genproduktes, Überexpression des RhtC-Genproduktes, Überexpression des YfiK-Genproduktes, Überexpression einer Pyruvat-Carboxylase, und Abschwächung der Essigsäurebildung.

[0023] Es wurde gefunden, dass Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae nach Überexpression des galP-Gens, in verbesserter Weise L-Aminosäuren ausgewählt aus der Gruppe L-Valin, L-Homoserin, L-Lysin und L-Threonin produzieren.

[0024] Die Nukleotidsequenzen der Gene 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.

[0025] Das galP-Gen wird unter anderem durch folgende Angaben beschrieben:

Bezeichnung: Zucker-Transporter, Galaktose-Proton-Symporter

Funktion: als integrales Membranprotein, Symport von 2-Deoxy-D-Galactose und einem Proton in die Zelle

Referenz: Macpherson et al.; The Journal of Biological Chemistry 258(7): 4390–4396 (1983)

Venter et al.; The Biochemical Journal 363 (Pt 2): 243–252 (2002)

Accession No.: AE000377

[0026] Die Galaktose-Permease in Salmonella typhimurium wird unter anderem in folgenden Referenzen beschrieben:

Postma PW; Journal of Bacteriology 129(2): 630–639 (1977);

Nagelkerke und Postma; Journal of Bacteriology 133(2): 607–613 (1978)

[0027] Die Nukleinsäuresequenzen können der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI), der National Library of Medicine (Bethesda, MD, USA), der Nukleotidsequenz-Datenbank des European Molecular Biology Laboratory (EMBL, Heidelberg, Deutschland bzw. Cambridge, UK) oder der DNA Datenbank von Japan (DDBJ, Mishima, Japan) entnommen werden.

[0028] Aus Gründen der besseren Klarheit ist die Nukleotidsequenz des galP-Gens aus Escherichia coli als SEQ ID NO:3 und die von diesem Gen kodierte Aminosäuresequenz des Galaktose-Protonen-Symporterproteins als SEQ ID NO:4 angegeben.

[0029] Die in den angegebenen Textstellen beschriebenen Gene können erfindungsgemäß verwendet wer-

den. Weiterhin können Allele der Gene verwendet werden, die sich aus der Degeneriertheit des genetischen Codes oder durch funktionsneutrale Sense-Mutationen ergeben. Die Verwendung endogener Gene wird bevorzugt.

[0030] Unter "endogenen Genen" oder "endogenen Nukleotidsequenzen" versteht man die in der Population einer Art vorhandenen Gene oder Allele beziehungsweise Nukleotidsequenzen.

[0031] Zu den Allelen, die funktionsneutrale Sense-Mutationen enthalten, zählen solche, die zu wenigstens einem konservativen Aminosäureaustausch in dem von ihnen kodierten Protein führen.

[0032] Bei aromatischen Aminosäuren spricht man dann von konservativen Austauschen, wenn Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin gegeneinander ausgetauscht werden. Bei hydrophoben Aminosäuren spricht man dann von konservativen Austauschen, wenn Leucin, Isoleucin und Valin gegeneinander ausgetauscht werden. Bei polaren Aminosäuren spricht man dann von konservativen Austauschen, wenn Glutamin und Asparagin gegeneinander ausgetauscht werden. Bei basischen Aminosäuren spricht man dann von konservativen Austauschen, wenn Arginin, Lysin und Histidin gegeneinander ausgetauscht werden. Bei sauren Aminosäuren spricht man dann von konservativen Austauschen, wenn Asparaginsäure und Glutaminsäure gegeneinander ausgetauscht werden. Bei hydroxylgruppenhaltigen Aminosäuren spricht man dann von konservativen Austauschen, wenn Serin und Threonin gegeneinander ausgetauscht werden.

[0033] Auf die gleiche Weise lassen sich diejenigen Nukleotidsequenzen, die für Varianten der genannten Proteine, die zusätzlich am N- oder C-Terminus um wenigstens eine (1) Aminosäure verlängert oder verkürzt sind, kodieren, verwenden. Diese Erweiterung oder Reduzierung betrifft nicht mehr als 50, 40, 30, 20, 10, 5, 3 oder 2 Aminosäuren bzw. Aminosäuregruppierungen.

[0034] Zur Erzielung einer Überexpression kann z. B. die Kopienzahl der entsprechenden Gene 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. Zu den verwendbaren Promotoren zählen unter anderem Promotoren der Lactose- und Tryptophan-Operons aus *Escherichia coli*, die unter dem Namen lac- bzw. trp-Promotor bekannt sind. Ein Hybridpromotor, der innerhalb des -10-Bereichs des lac-Promotors bzw. des -35-Bereichs des trp-Promotors liegt, ist der tac-Promotor (DeBoer et al.; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 80: 21–25 (1983)). Als weitere Promotoren können der linksgerichtete P_L-Promotor der Lambda-Bakteriophagen sowie Promotoren der T7-Phagen, die mit einem Repressor Wechselwirken, wie übrigens auch die bereits erwähnten Promotoren lac, trp und tac, verwendet werden, wobei sich die Transkription klonierter Gene spezifisch an- oder abschalten lässt. 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.

[0035] 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 WO98/04715, 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.

[0036] 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 das galP-Gen kodierende Nukleotidsequenz trägt.

[0037] Unter dem Begriff Transformation versteht man die Aufnahme einer isolierten Nukleinsäure durch einen Wirt (Mikroorganismus).

[0038] Es ist ebenfalls möglich, Mutationen, die die Expression des jeweiligen Gens betreffen, durch Sequenzaustausch (Hamilton et al.; *Journal of Bacteriology* 171: 4617–4622 (1989)), Konjugation oder Transduktion in verschiedene Stämme zu überführen.

[0039] Nähere Erläuterungen zu 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 und Stryer (*Biochemistry*, 5th ed., Freeman and Company, New York (USA), 2002) oder dem Handbuch von Sambrook et al. (*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, (3-bändige Ausgabe), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001).

[0040] Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren ausgewählt aus der Gruppe L-Valin, L-Homoserin, L-Lysin und L-Threonin mit Stämmen der Familie Enterobacteriaceae vorteilhaft sein, zusätzlich zur Überexpression des galP-Gens ein oder mehrere Enzyme des bekannten Threonin-Biosyntheseweges oder Enzyme des anoperotischen Stoffwechsels oder Enzyme für die Produktion von reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat oder Enzyme der Glykolyse oder PTS-Enzyme oder Enzyme des Schwefelstoffwechsels zu überexprimieren. Die Verwendung endogener Gene wird im Allgemeinen bevorzugt.

[0041] 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 (*Gene* 31: 279–283 (1984)),
- 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 für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen (WO 02/06459),
- 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 Glucokinase kodierende Gen glk (*Journal of Bacteriology* 179: 1298–1306 (1997)),
- das für das DNA-Bindeprotein HLP-II kodierende hns-Gen (WO 03/004671),
- 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 ptsHI-Gen des ptsHIcrr-Operons (WO 03/004674),
- das für das Enzym I des Phosphotransferase-Systems PTS kodierende ptsI-Gen des ptsHIcrr-Operons (WO 03/004674),
- das für die Glucose-spezifische IIA Komponente des Phosphotransferase-Systems PTS kodierende crr-Gen des ptsHIcrr-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 globalen Regulator Csr kodierende csrA-Gen (*Journal of Bacteriology* 175: 4744–4755 (1993)),
- das für den Regulator des fad-Regulons kodierende fadR-Gen (*Nucleic Acids Research* 16: 7995–8009 (1988)),
- das für den Regulator des zentralen Intermediärstoffwechsels kodierende ic1R-Gen (*Journal of Bacteriology* 172: 2642–2649 (1990)),
- das für das 10 KDa Chaperon kodierende mopB-Gen (WO 03/004669), das auch unter der Bezeichnung groES bekannt ist,
- 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 *cysJIH*-Operons (WO 03/006666),
- das für die Adenylylsulfat-Reduktase kodierende *cysH*-Gen des *cysJIH*-Operons (WO 03/006666),
- das für den positiven Regulator *PhoB* des *pho* Regulons kodierende *phoB*-Gen des *phoBR*-Operons (WO 03/008606),
- das für das Sensorprotein des *pho* Regulons kodierende *phoR*-Gen des *phoBR*-Operons (WO 03/008606),
- das für das Protein E der äußeren Zellmembran kodierende *phoE*-Gen (WO 03/008608),
- das für die, durch Fructose stimulierte, Pyruvat Kinase I kodierende *pykF*-Gen (WO 03/008609),
- das für die 6-Phosphofruktokinase II kodierende *pfkB*-Gen (WO 03/008610),
- das für das periplasmatische Bindeprotein des Maltose-Transports kodierende *malE*-Gen (WO 03/008605),
- das für die Superoxiddismutase kodierende *sodA*-Gen (WO 03/008613),
- das für ein Membranprotein mit anti- σ E-Aktivität kodierende *rseA*-Gen des *rseABC*-Operons (WO 03/008612),
- das für einen globalen Regulator des σ E-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 *sucABCD*-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 Adenylat-Kinase kodierende *adk*-Gen (Nucleic Acids Research 13(19): 7139–7151 (1985)),
- das für ein periplasmatisches Protein mit Chaperonin-artiger Funktion kodierende *hdeA*-Gen (Journal of Bacteriology 175(23): 7747–7748 (1993)),
- das für ein periplasmatisches Protein mit Chaperonin-artiger Funktion kodierende *hdeB*-Gen (Journal of Bacteriology 175(23): 7747–7748 (1993)),
- das für die Isocitrat-Dehydrogenase kodierende *icd*-Gen (Journal of Biological Chemistry 262(22): 10422–10425 (1987)),
- das für das periplasmatische, Galaktose-bindende Transportprotein kodierende *mgIB*-Gen (Molecular and General Genetics 229(3): 453–459 (1991)),
- das für die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase kodierende *lpd*-Gen (European Journal of Biochemistry 135(3): 519–527 (1983)),
- das für die E1-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodierende *aceE*-Gen (European Journal of Biochemistry 133(1): 155–162 (1983)),
- das für die E2-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodierende *aceF*-Gen (European Journal of Biochemistry 133(3): 481–489 (1983)),
- das für die Aminopeptidase B kodierende *pepB*-Gen (Journal of Fermentation and Bioengineering 82: 392–397 (1996))
- das für die Aldehyd-Dehydrogenase (E.C. 1.2.1.3) kodierende *aldH*-Gen (Gene 99(1): 15–23 (1991)),
- das für das Eisen-Speicher-Homoprotein (Bacterioferritin) kodierende *bfr*-Gen (Journal of Bacteriology 171(7): 3940–3947 (1989))
- das für die Uridin-Phosphorylase kodierende *udp*-Gen (Nucleic Acids Research 17(16): 6741 (1989)) und
- das für den Regulator der σ E-Faktor-Aktivität kodierende *rseB*-Gen (Molecular Microbiology 24(2): 355–371 (1997))

überexprimiert werden.

[0042] Weiterhin kann es für die Produktion der oben genannten L-Aminosäuren vorteilhaft sein, zusätzlich zur Überexpression des *galP*-Gens, 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 02/36797),
 – das für das Enzym Isocitrat-Lyase kodierende aceA-Gen (WO 02/081722),
 – 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,
 – das für die Aspartat Ammonium-Lyase kodierende aspA-Gen (WO 03/008603) und
 – das für die Malatsynthase A kodierende aceB-Gen (WO 03/008604) abzuschwächen, insbesondere auszuschalten oder die Expression zu verringern.

[0043] 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 niedrigeren Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Enzym oder Protein oder Gen inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

[0044] Durch die Maßnahme 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 im Ausgangs-Mikroorganismus herabgesenkt.

[0045] Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Überexpression des galP-Gens, unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

[0046] 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 ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioproszestechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) gegeben.

[0047] 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.

[0048] 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.

[0049] Als Stickstoffquelle können organische Stickstoffhaltige 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.

[0050] 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 auch essentielle Wuchsstoffe 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.

[0051] 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 Gase 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.

[0052] 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.

[0053] Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, wie beispielsweise L-Threonin, L-Isoleucin, L-Valin, L-Methionin, L-Homoserin und L-Lysin, insbesondere L-Threonin.

[0054] Die vorliegende Erfindung wird im Folgenden anhand von Arbeitsbeispielen näher erläutert.

[0055] Das Minimal-(M9) bzw. Vollmedium (LB) für *Escherichia coli* ist 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 in Verbindung mit Restriktion, Ligation sowie Behandlung mit Klenow und alkalischer Phosphatase werden nach den Verfahren, wie sie bei Sambrook et al. (Molecular Cloning – A Laboratory Manual. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press) beschrieben sind, durchgeführt. Die Transformation von *Escherichia coli* wird, wenn nicht anders angegeben, nach Chung et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 86: 2172–2175 (1989)) durchgeführt.

[0056] Die Inkubationstemperatur während der Produktion von Stämmen und Transformanten liegt bei 37°C.

BEISPIEL 1

Konstruktion des Expressionsplasmids pTrc99AgaIP

[0057] Das galP-Gen aus *E. coli* K12 wird unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR) sowie synthetischer Oligonukleotide amplifiziert. Ausgehend von der Nukleotidsequenz des galP-Gens in *E. coli* K12 Mg1655 (Accession Number AE000377, Blattner et al. (Science 277: 1453–1474 (1997))), werden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech., Ebersberg, Deutschland). Die Sequenzen der Primer sind dabei so modifiziert, daß Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme entstehen. Die Erkennungssequenz für XbaI wird für den Primer galP1 und die Erkennungsstelle für HindIII für den Primer galP2 gewählt, wobei diese Stellen zur Kennzeichnung in den unten dargestellten Nukleotidsequenzen unterstrichen sind:

galP1:

5' -CACAATCTAGATAAACCATATTGGAGGGCATC - 3' (SEQ ID NO:1)

galP2:

5' -GGGAGGAAGCTTGGGGAGATTAATC-3' (SEQ ID NO:2)

[0058] Die für die PCR eingesetzte chromosomale DNA von *E. coli* K12 MG1655 wird nach Herstellerangaben mit "Qiagen Genomic-tips 100/G" (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert. Ein ungefähr 1450 Bp großes DNA-Fragment lässt sich mit den spezifischen Primern unter Standard-PCR-Bedingungen (Innfis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) mit der Vent-DNA-Polymerase (New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland) amplifizieren (SEQ ID NO:3).

[0059] Das amplifizierte galP-Fragment wird mit den Enzymen XbaI und HindIII geschnitten und mit dem Vek-

tor pTrc99A (Pharmacia Biotech., Uppsala, Schweden), der mit den Enzymen XbaI und HindIII verdaut wurde, ligiert. Der E. coli-Stamm TOP 10 One Shot® (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Groningen, Niederlande) wird mit dem Ligationsansatz transformiert, und plasmidhaltige Zellen werden auf LB-Agar, der mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt ist, selektioniert. Die erfolgreiche Klonierung kann nach Plasmid-DNA-Isolierung durch Kontrollspaltung mit den Enzymen XbaI, HindIII und EcoRV nachgewiesen werden. Das Plasmid erhält die Bezeichnung pTrc99AgalP ([Fig. 1](#)).

BEISPIEL 2

Herstellung von L-Threonin mit dem Stamm MG442/pTrc99AgalP

[0060] Der L-Threonin produzierende E. coli-Stamm MG442 ist in der Patentschrift US-A-4,278,765 beschrieben und bei der Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM, Moskau, Russland) als CMIM B-1628 hinterlegt.

[0061] Der Stamm MG442 wird mit dem in Beispiel 1 beschriebenen Expressionsplasmid pTrc99AgalP sowie mit dem Vektor pTrc99A transformiert, und plasmidhaltige Zellen werden auf LB-Agar mit 50 µg/ml Ampicillin selektioniert. Die erfolgreiche Transformation lässt sich nach Plasmid-DNA-Isolierung durch Kontrollspaltung mit den Enzymen HincII, BamHI und KpnI bestätigen. Auf diese Weise erhält man die Stämme MG442/pTrc99AgalP 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. Die Bildung von L-Threonin wird in Batch-Kulturen von 10 ml, die in 100-ml-Erlenmeyerkolben angesetzt werden, überprüft. Dabei werden in die Kolben jeweils 10 ml Vorkulturmedium in 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 gegeben, beimpft und 16 Stunden bei 37°C und 180 Upm auf einem ESR-Inkubator der Firma Kühner AG (Birsfelden, Schweiz) inkubiert. Je 250 µl dieser Vorkulturen werden dann 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 der Ansatz wird 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Bildung von L-Threonin durch den Ausgangsstamm MG442 wird in gleicher 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 Co. (Düsseldorf, Deutschland) bei einer Messwellenlänge von 66 nm bestimmt.

[0062] Schließlich wird die Konzentration an gebildetem L-Threonin im steril filtrierten Kulturüberstand mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) mittels Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenreaktion mit Ninhydrinnachweis bestimmt.

[0063] In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuchs dargestellt.

Tabelle 1

Stamm	OD (600 nm)	L-Threonin g/l
MG442	5,6	1,4
MG442/pTrc99A	3	1,3
MG442/pTrc99AgalP	4,1	1,9

Kurze Beschreibung der Figur:

[0064] [Fig. 1](#): Karte des das galP-Gen enthaltenden Plasmids pTrc99AgalP

[0065] Längenangaben sind als ungefähre Werte aufzufassen. Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben die folgende Bedeutung:

- Amp: Ampicillinresistenz-Gen
- lacI: Gen für das Repressorprotein in den trc-Promotoren
- Ptrc: trc-Promotorbereich, IPTG-induzierbar
- galP: Kodierender Bereich der galP-Gene
- 5S: 5S-rRNA-Bereich

- rrnBT; rRNA-Terminatorbereich

[0066] Die Abkürzungen für die Restriktionsenzyme haben die folgende Bedeutung:

- BamHI: Restriktionsendonuklease aus *Bacillus amyloliquefaciens* H
- EcoRV: Restriktionsendonuklease aus *Escherichia coli* B946
- HincII: Restriktionsendonuklease aus *Haemophilus influenzae* R_c
- HindIII: Restriktionsendonuklease aus *Haemophilus influenzae*
- KpnI: Restriktionsendonuklease aus *Klebsiella pneumoniae*
- XbaI: Restriktionsendonuklease aus *Xanthomonas badrii* (ATTC 11672)

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa AG

<120> Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae

<130> 020481 BT

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 32

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(32)

<223> galP1

<400> 1

cacaatctag ataaaccata ttggagggca tc

32

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(25)

<223> galP2

<400> 2

gggaggaagc ttggggagat taatc

25

<210> 3

<211> 1446

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

<220>

<221> DNA-Fragment

<222> (1)..(1446)

<223> PCR product

<220>

<221> CDS

<222> (33)..(1427)

<223> galP-kodierender Bereich

<400> 3

cacaatctag ataaaccata ttggagggca tc atg cct gac gct aaa aaa cag	53
Met Pro Asp Ala Lys Lys Gln	
1 5	
ggg cgg tca aac aag gca atg acg ttt ttc gtc tgc ttc ctt gcc gct	101
Gly Arg Ser Asn Lys Ala Met Thr Phe Phe Val Cys Phe Leu Ala Ala	
10 15 20	
ctg gcg gga tta ctc ttt ggc ctg gat atc ggt gta att gct ggc gca	149
Leu Ala Gly Leu Leu Phe Gly Leu Asp Ile Gly Val Ile Ala Gly Ala	
25 30 35	
ctg ccg ttt att gca gat gaa ttc cag att act tcg cac acg caa gaa	197
Leu Pro Phe Ile Ala Asp Glu Phe Gln Ile Thr Ser His Thr Gln Glu	
40 45 50 55	
tgg gtc gta agc tcc atg atg ttc ggt gcg gca gtc ggt gcg gtg ggc	245
Trp Val Val Ser Ser Met Met Phe Gly Ala Ala Val Gly Ala Val Gly	
60 65 70	
agc ggc tgg ctc tcc ttt aaa ctc ggg cgc aaa aag agc ctg atg atc	293
Ser Gly Trp Leu Ser Phe Lys Leu Gly Arg Lys Lys Ser Leu Met Ile	
75 80 85	
ggc gca att ttg ttt gtt gcc ggt tcg ctg ttc tct gcg gct gcg cca	341
Gly Ala Ile Leu Phe Val Ala Gly Ser Leu Phe Ser Ala Ala Ala Pro	
90 95 100	
aac gtt gaa gta ctg att ctt tcc cgc gtt cta ctg ggg ctg gcg gtg	389
Asn Val Glu Val Leu Ile Leu Ser Arg Val Leu Gly Leu Ala Val	
105 110 115	
ggt gtg gcc tct tat acc gca cgc ctg tac ctc tct gaa att gcg ccg	437
Gly Val Ala Ser Tyr Thr Ala Pro Leu Tyr Leu Ser Glu Ile Ala Pro	
120 125 130 135	
gaa aaa att cgt ggc agt atg atc tcg atg tat cag ttg atg atc act	485
Glu Lys Ile Arg Gly Ser Met Ile Ser Met Tyr Gln Leu Met Ile Thr	
140 145 150	
atc ggg atc ctc ggt gct tat ctt tct gat acc gcc ttc agc tac acc	533
Ile Gly Ile Leu Gly Ala Tyr Leu Ser Asp Thr Ala Phe Ser Tyr Thr	
155 160 165	
ggt gca tgg cgc tgg atg ctg ggt gtg att atc atc ccg gca att ttg	581
Gly Ala Trp Arg Trp Met Leu Gly Val Ile Ile Ile Pro Ala Ile Leu	
170 175 180	
ctg ctg att ggt gtc ttc ttc ctg cca gac agc cca cgt tgg ttt gcc	629
Leu Leu Ile Gly Val Phe Phe Leu Pro Asp Ser Pro Arg Trp Phe Ala	
185 190 195	
gcc aaa cgc cgt ttt gtt gat gcc gaa cgc gtg ctg cta cgc ctg cgt	677
Ala Lys Arg Arg Phe Val Asp Ala Glu Arg Val Leu Leu Arg Leu Arg	
200 205 210 215	
gac acc agc gcg gaa gcg aaa cgc gaa ctg gat gaa atc cgt gaa agt	725
Asp Thr Ser Ala Glu Ala Lys Arg Glu Leu Asp Glu Ile Arg Glu Ser	
220 225 230	

ttg cag gtt aaa cag agt ggc tgg gcg ctg ttt aaa gag aac agc aac 773
 Leu Gln Val Lys Gln Ser Gly Trp Ala Leu Phe Lys Glu Asn Ser Asn
 235 240 245

ttc cgc cgc gcg gtg ttc ctt ggc gta ctg ttg cag gta atg cag caa 821
 Phe Arg Arg Ala Val Phe Leu Gly Val Leu Leu Gln Val Met Gln Gln
 250 255 260

ttc acc ggg atg aac gtc atc atg tat tac gcg ccg aaa atc ttc gaa 869
 Phe Thr Gly Met Asn Val Ile Met Tyr Tyr Ala Pro Lys Ile Phe Glu
 265 270 275

ctg gcg ggt tat acc aac act acc gag caa atg tgg ggg acc gtg att 917
 Leu Ala Gly Tyr Thr Asn Thr Thr Glu Gln Met Trp Gly Thr Val Ile
 280 285 290 295

gtc ggc ctg acc aac gta ctt gcc acc ttt atc gca atc ggc ctt gtt 965
 Val Gly Leu Thr Asn Val Leu Ala Thr Phe Ile Ala Ile Gly Leu Val
 300 305 310

gac cgc tgg gga cgt aaa cca acg cta acg ctg ggc ttc ctg gtg atg 1013
 Asp Arg Trp Gly Arg Lys Pro Thr Leu Thr Leu Gly Phe Leu Val Met
 315 320 325

gct gct ggc atg ggc gta ctc ggt aca atg atg cat atc ggt att cac 1061
 Ala Ala Gly Met Gly Val Leu Gly Thr Met Met His Ile Gly Ile His
 330 335 340

tct ccg tcg gcg cag tat ttc gcc atc gcc atg ctg ctg atg ttt att 1109
 Ser Pro Ser Ala Gln Tyr Phe Ala Ile Ala Met Leu Leu Met Phe Ile
 345 350 355

gtc ggt ttt gcc atg agt gcc ggt ccg ctg att tgg gta ctg tgc tcc 1157
 Val Gly Phe Ala Met Ser Ala Gly Pro Leu Ile Trp Val Leu Cys Ser
 360 365 370 375

gaa att cag ccg ctg aaa ggc cgc gat ttt ggc atc acc tgc tcc act 1205
 Glu Ile Gln Pro Leu Lys Gly Arg Asp Phe Gly Ile Thr Cys Ser Thr
 380 385 390

gcc acc aac tgg att gcc aac atg atc gtt ggc gca acg ttc ctg acc 1253
 Ala Thr Asn Trp Ile Ala Asn Met Ile Val Gly Ala Thr Phe Leu Thr
 395 400 405

atg ctc aac acg ctg ggt aac gcc aac acc ttc tgg gtg tat gcg gct 1301
 Met Leu Asn Thr Leu Gly Asn Ala Asn Thr Phe Trp Val Tyr Ala Ala
 410 415 420

ctg aac gta ctg ttt atc ctg ctg aca ttg tgg ctg gta ccg gaa acc 1349
 Leu Asn Val Leu Phe Ile Leu Leu Thr Leu Trp Leu Val Pro Glu Thr
 425 430 435

aaa cac gtt tcg ctg gaa cat att gaa cgt aat ctg atg aaa ggt cgt 1397
 Lys His Val Ser Leu Glu His Ile Glu Arg Asn Leu Met Lys Gly Arg
 440 445 450 455

aaa ctg cgc gaa ata ggc gct cac gat taa tctccccaag cttcctccc 1446
 Lys Leu Arg Glu Ile Gly Ala His Asp
 460

<210> 4

<211> 464

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 4

Met Pro Asp Ala Lys Lys Gln Gly Arg Ser Asn Lys Ala Met Thr Phe
 1 5 10 15

Phe Val Cys Phe Leu Ala Ala Leu Ala Gly Leu Leu Phe Gly Leu Asp
 20 25 30

Ile Gly Val Ile Ala Gly Ala Leu Pro Phe Ile Ala Asp Glu Phe Gln
 35 40 45

Ile Thr Ser His Thr Gln Glu Trp Val Val Ser Ser Met Met Phe Gly
 50 55 60

Ala Ala Val Gly Ala Val Gly Ser Gly Trp Leu Ser Phe Lys Leu Gly
 65 70 75 80

Arg Lys Lys Ser Leu Met Ile Gly Ala Ile Leu Phe Val Ala Gly Ser
 85 90 95

Leu Phe Ser Ala Ala Ala Pro Asn Val Glu Val Leu Ile Leu Ser Arg
 100 105 110

Val Leu Leu Gly Leu Ala Val Gly Val Ala Ser Tyr Thr Ala Pro Leu
 115 120 125

Tyr Leu Ser Glu Ile Ala Pro Glu Lys Ile Arg Gly Ser Met Ile Ser
 130 135 140

Met Tyr Gln Leu Met Ile Thr Ile Gly Ile Leu Gly Ala Tyr Leu Ser
 145 150 155 160

Asp Thr Ala Phe Ser Tyr Thr Gly Ala Trp Arg Trp Met Leu Gly Val
 165 170 175

Ile Ile Ile Pro Ala Ile Leu Leu Leu Ile Gly Val Phe Phe Leu Pro
 180 185 190

Asp Ser Pro Arg Trp Phe Ala Ala Lys Arg Arg Phe Val Asp Ala Glu
 195 200 205

Arg Val Leu Leu Arg Leu Arg Asp Thr Ser Ala Glu Ala Lys Arg Glu
 210 215 220

Leu Asp Glu Ile Arg Glu Ser Leu Gln Val Lys Gln Ser Gly Trp Ala
 225 230 235 240

Leu Phe Lys Glu Asn Ser Asn Phe Arg Arg Ala Val Phe Leu Gly Val
 245 250 255

Leu Leu Gln Val Met Gln Gln Phe Thr Gly Met Asn Val Ile Met Tyr
 260 265 270

Tyr Ala Pro Lys Ile Phe Glu Leu Ala Gly Tyr Thr Asn Thr Thr Glu
 275 280 285

Gln Met Trp Gly Thr Val Ile Val Gly Leu Thr Asn Val Leu Ala Thr
 290 295 300

Phe Ile Ala Ile Gly Leu Val Asp Arg Trp Gly Arg Lys Pro Thr Leu
 305 310 315 320

Thr Leu Gly Phe Leu Val Met Ala Ala Gly Met Gly Val Leu Gly Thr
 325 330 335

Met Met His Ile Gly Ile His Ser Pro Ser Ala Gln Tyr Phe Ala Ile
 340 345 350

Ala Met Leu Leu Met Phe Ile Val Gly Phe Ala Met Ser Ala Gly Pro
 355 360 365

Leu Ile Trp Val Leu Cys Ser Glu Ile Gln Pro Leu Lys Gly Arg Asp
 370 375 380

Phe Gly Ile Thr Cys Ser Thr Ala Thr Asn Trp Ile Ala Asn Met Ile
 385 390 395 400

Val Gly Ala Thr Phe Leu Thr Met Leu Asn Thr Leu Gly Asn Ala Asn
 405 410 415

Thr Phe Trp Val Tyr Ala Ala Leu Asn Val Leu Phe Ile Leu Leu Thr
 420 425 430

Leu Trp Leu Val Pro Glu Thr Lys His Val Ser Leu Glu His Ile Glu
 435 440 445

Arg Asn Leu Met Lys Gly Arg Lys Leu Arg Glu Ile Gly Ala His Asp
 450 455 460

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren aus der Gruppe L-Threonin, L-Valin, L-Homoserin und L-Lysin, bei dem man

a) die gewünschten L-Aminosäuren bereits produzierenden Mikroorganismen der Gattung Escherichia, in denen man das galP-Gen oder für das Genprodukt Galaktose-Proton-Symporter kodierende Nukleotidsequenzen überexprimiert, wobei der Begriff "Überexpression" die Erhöhung der intrazellularen Aktivität oder Konzentration des genannten Genprodukts bezogen auf die Aktivität oder Konzentration des genannten Genprodukts im Ausgangs-Mikroorganismus beschreibt, wobei in den genannten Mikroorganismen das Phospho-Transferase-Transportsystem (PTS) gegenüber der entsprechenden Wildtyp-PTS-Zelle nicht inaktiviert ist, fermentiert,

- b) die gewünschte L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen anreichert und
 c) die gewünschte L-Aminosäure isoliert, wobei die Biomasse in ihrer Gesamtheit oder Anteilen (≥ 0 bis 100%) im Produkt verbleiben.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem man zur Überexpression der für das Genprodukt galP kodierende Polynukleotidsequenz(en) die Kopienzahl des genannten Gens erhöht.

3. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem man Mikroorganismen fermentiert, in denen man zusätzlich gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe:

- 3.1 das für die Aspartatkinase, die Homoserin-Dehydrogenase, die Homoserinkinase und die Threoninsynthese kodierende thrABC-Operon,
- 3.2 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-Gen,
- 3.3 das für die Phosphoenolpyruvat-Synthase kodierende pps-Gen,
- 3.4 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase kodierende ppc-Gen,
- 3.5 die für die Transhydrogenase kodierenden Gene pntA und pntB,
- 3.6 das Homoserinresistenz vermittelnde Gen rhtB,
- 3.7 das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen,
- 3.8 das Threoninresistenz vermittelnde Gen rhtC,
- 3.9 das für das Threoninexport-Protein kodierende thrE-Gen,
- 3.10 das für die Glutamat-Dehydrogenase kodierende gdhA-Gen,
- 3.11 das für die Glucokinase kodierende Gen glk,
- 3.12 das für das DNA-Bindeprotein HLP-II kodierende hns-Gen,
- 3.13 das für die Phosphoglucomutase kodierende pgm-Gen,
- 3.14 das für die Fructose Biphosphat Aldolase kodierende fba-Gen,
- 3.15 das für die Phosphohistidin-Protein-Hexose-Phosphotransferase kodierende ptsH-Gen,
- 3.16 das für das Enzym I des Phosphotransferase-Systems kodierende ptsI-Gen,
- 3.17 das für die Glucose-spezifische IIA Komponente kodierende crr-Gen,
- 3.18 das für die Glucose-spezifische IIBC Komponente kodierende ptsG-Gen,
- 3.19 das für den Regulator des Leucin-Regulons kodierende lrp-Gen,
- 3.20 das für den globalen Regulator Csr kodierende csrA-Gen,
- 3.21 das für den Regulator des fad-Regulons kodierende fadR-Gen,
- 3.22 das für den Regulator des zentralen Intermediärstoffwechsels kodierende ic1R-Gen,
- 3.23 das für das 10 KDa Chaperon kodierende mopB-Gen,
- 3.24 das für die kleine Untereinheit der Alkyl Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpC-Gen,
- 3.25 das für die große Untereinheit der Alkyl Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpF-Gen,
- 3.26 das für die Cystein-Synthase A kodierende cysK-Gen,
- 3.27 das für den Regulator des cys-Regulons kodierende cysB-Gen,
- 3.28 das für das Flavoprotein der NADPH-Sulfit-Reduktase kodierende cysJ-Gen,
- 3.29 das für das Hämoprotein der NADPH-Sulfit-Reduktase kodierende cysI-Gen,
- 3.30 das für die Adenylylsulfat-Reduktase kodierende cysH-Gen,
- 3.31 das für den positiven Regulator PhoB des pho Regulons kodierende phoB-Gen,
- 3.32 das für das Sensorprotein des pho Regulons kodierende phoR-Gen,
- 3.33 das für das Protein E der äußeren Zellmembran kodierende phoE-Gen,
- 3.34 das für die, durch Fructose stimulierte, Pyruvat Kinase I kodierende pykF-Gen,
- 3.35 das für die 6-Phosphofruktokinase II kodierende pfkB-Gen,
- 3.36 das für das periplasmatische Bindeprotein des Maltose-Transports kodierende malE-Gen,
- 3.37 das für die Superoxiddismutase kodierende sodA-Gen,
- 3.38 das für ein Membranprotein mit anti-sigmaE-Aktivität kodierende rseA-Gen,
- 3.39 das für einen globalen Regulator des sigmaE-Faktors kodierende rseC-Gen,
- 3.40 das für die Decarboxylase Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucA-Gen,
- 3.41 das für die Dihydrolipoyltranssuccinase E2 Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucB-Gen,
- 3.42 das für die β -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende sucC-Gen,
- 3.43 das für die α -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende sucD-Gen,
- 3.44 das für die Adenylat-Kinase kodierende adk-Gen,
- 3.45 das für ein periplasmatisches Protein mit Chaperonin-artiger Funktion kodierende hdeA-Gen,
- 3.46 das für ein periplasmatisches Protein mit Chaperonin-artiger Funktion kodierende hdeB-Gen,
- 3.47 das für die Isocitrat-Dehydrogenase kodierende icd-Gen,
- 3.48 das für das periplasmatische, Galaktosebindende Transportprotein kodierende mgIB-Gen,
- 3.49 das für die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase kodierende lpd-Gen,

- 3.50 das für die E1-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodierende aceE-Gen,
- 3.51 das für die E2-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodierende aceF-Gen,
- 3.52 das für die Aminopeptidase B kodierende pepB-Gen und
- 3.53 das für die Aldehyd-Dehydrogenase kodierende aldH-Gen,
- 3.54 das für das Eisen-Speicher-Homoprotein kodierende bfr-Gen,
- 3.55 das für die Uridin-Phosphorylase kodierende udp-Gen und
- 3.56 das für den Regulator der SigmaE-Faktor-Aktivität kodierende rseB-Gen überexprimiert.

4. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem man Mikroorganismen fermentiert, in denen man zusätzlich gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe:

- 4.1 das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-Gen,
- 4.2 das für die Malat-Dehydrogenase kodierende mdh-Gen, 4.3 das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) yjfA,
- 4.4 das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) ytfP,
- 4.5 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende pckA-Gen,
- 4.6 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende poxB-Gen,
- 4.7 das für die Isocitrat-Lyase kodierende aceA-Gen,
- 4.8 das für den DgsA-Regulator des Phosphotransferase-Systems kodierende dgsA-Gen,
- 4.9 das für den Fructose-Repressor kodierende fruR-Gen,
- 4.10 das für den Sigma38-Faktor kodierende rpoS-Gen,
- 4.11 das für die Aspartat Ammonium-Lyase kodierende aspA-Gen und
- 4.12 das für die Malatsynthase A kodierende aceB-Gen
abschwächt, insbesondere ausschaltet oder die Expression verringert.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Figur 1: Karte des Plasmids pTrc99AgalP

