



(10) **DE 602 08 459 T3** 2012.04.05

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 254 957 B2**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 08 459.8**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 00 8316.8**

(96) Europäischer Anmeldetag: **11.04.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **06.11.2002**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **04.01.2006**

(97) Veröffentlichungstag

des geänderten Patents beim EPA: **18.01.2012**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **05.04.2012**

(51) Int Cl.: **C12N 15/31** (2006.01)

C07K 14/245 (2006.01)

C12P 13/04 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

C12P 13/22 (2006.01)

Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert

(30) Unionspriorität:

2001135517

02.05.2001

JP

(84) Benannte Vertragsanstalten:

DE, FR, GB, IT

(73) Patentinhaber:

Ajinomoto Co., Inc., Tokio/Tokyo, JP

(72) Erfinder:

Tsujimoto, Nobuharu, Ajinomoto Co., Kawasaki-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa, JP; Suzuki, Tomoko, Ajinomoto Co., Kawasaki-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa, JP; Ito, Hisao, Ajinomoto Co., Kawasaki-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa, JP

(74) Vertreter:

Strehl, Schübel-Hopf & Partner, 80538, München, DE

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Herstellung einer L-Aminosäure mittels Fermentation**

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer L-Aminosäure unter Verwendung eines Mikroorganismus.

Beschreibung des Standes der Technik

[0002] Als typische Verfahren zur Herstellung von Substanzen unter Verwendung von Mikroorganismen sind Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren durch Fermentation bekannt. L-Aminosäuren werden nicht nur als Würzstoffe und Nahrungsmittel, sondern auch als Komponenten für verschiedene Nahrungsmittelgemische für medizinische Zwecke eingesetzt. Außerdem werden sie als Additive für Tiernahrung, Reagenzien bei der Arzneimittelherstellung und in der chemischen Industrie und als Wachstumsfaktoren für die Produktion von L-Aminosäuren, wie L-Lysin und L-Homoserin, unter Verwendung eines Mikroorganismus eingesetzt. Als Mikroorganismen, die L-Aminosäuren durch Fermentation produzieren können, sind coryneforme Bakterien, Escherichia-Bakterien, Bacillus-Bakterien, Serratia-Bakterien und dergleichen bekannt.

[0003] Was die vorstehend beschriebene Produktion von Zielsubstanzen durch Fermentation betrifft, sind die meisten der Materialien, die als Ausgangsmaterialien eingesetzt werden, solche, die Saccharide enthalten, wie Restmelasse. Bei der Aminosäurefermentation oder der Nucleinsäurefermentation wird ebenfalls die Kultivierung unter Verwendung eines Saccharids als Ausgangsmaterial durchgeführt. Obwohl Zuckerrohr und dergleichen reichlich Stärke enthalten, wird es als solches kaum als Ausgangsmaterial eingesetzt, vielmehr wird es in den meisten Fällen als Zersetzungsprodukt verwendet, worin Stärke beispielsweise in Monosaccharide oder Disaccharide zersetzt ist. Bei dem Zersetzungsverfahren wird im Allgemeinen eine Lösung eines Zucker zersetzenden Enzyms, wie Amylase, verwendet, wodurch die Stärke, die ein Polysaccharid ist, in relativ niedermolekulare Saccharide, wie Glucose, Maltose und Maltotriose, zersetzt wird.

[0004] Bei der Fermentation unter Verwendung von Gram-negativen Enterobakterien, wie Escherichia coli (E. coli) verursacht die Verwendung einer solchen Stärkezersetzungs-Lösung ein Problem. Beispielsweise verbraucht E. coli die als Hauptkomponente vorhandene Glucose, E. coli leidet jedoch an der so genannten Glucoserepression, was bedeutet, dass Oligosaccharide, die zwei oder mehr Monosaccharide enthalten, wie Maltose, nur verbraucht werden, nachdem die Monosaccharide vollständig verbraucht worden sind. Wenn die Fermentation zu einem Zeitpunkt beendet wird, zu dem nur Glucose, welche die Hauptkomponente der Stärkezersetzungs-Lösung ist, verbraucht worden ist, werden Oligosaccharide, wie Maltose, nicht assimiliert, sondern bleiben ungenutzt. Wenn beabsichtigt wird, Oligosaccharide nach dem Verbrauch der Glucose zu verbrauchen, muss außerdem die Kultivierungsdauer verlängert werden, was zu einer ineffektiven Verschwendung der Nutzungskosten führt.

[0005] Es ist bekannt, dass E. coli und Salmonella typhimurium im Allgemeinen an der Glucoserepression leiden. Das heißt, wenn beabsichtigt wird, Glucose zusammen mit anderen Kohlenstoffquellen, wie Lactose, Maltose und Glycerin, zu assimilieren, wird zuerst Glucose assimiliert und später werden die anderen Kohlenstoffquellen assimiliert. Monod et al. haben entdeckt, dass wenn Lactose und Glucose als Kohlenstoffquellen eingesetzt wurden, ein Zweiphasenwachstum beobachtet wurde, d. h. eine so genannte Diauxie (Monod, J., Growth, 11, 223–247, 1947). Molekularbiologische Forschungen haben diesen Mechanismus aufgeklärt. Das heißt, IIA^{Glc} (Glucose-PTS-Enzym II), welches als Phosphatdonor für Glucose in der Phosphatkaskade zum Zeitpunkt der Assimilation in dem Glucosephosphoenolatpyruvat-Zuckerphosphotransferasesystem, d. h. in dem so genannten PTS-System, wirkt, liegt in einem dephosphorylierten Zustand vor. Die dephosphorylierte IIA^{Glc} verursacht den so genannten Induktorauschluss, bei dem die dephosphorylierte IIA^{Glc} die Aufnahme anderer Saccharide inhibiert (Postma P. W., Lengeler J. W. und Jacobson G. R.: in Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology (Hrsg. Neidhardt F. C.), S. 1149–1174, 1996, ASM Press, Washington D. C.).

[0006] Die Aufnahme von Maltose in Escherichia coli leidet unter der Glucoserepression, die durch die Wechselwirkung zwischen der dephosphorylierten IIA^{Glc} und dem MalK-Protein verursacht wird, welches das Aufnahmesystem für Maltose durch Nicht-PTS darstellt. Das heißt, wenn das Bakterium Glucose aufnimmt, ist IIA^{Glc} in der Zelle im Überschuss vorhanden und bindet an das MalK-Protein, wobei die Aufnahme von Maltose inhibiert wird. Außerdem wurde ein mutierter Stamm, der verbesserte Aufnahme von Maltose in Anwesenheit

eines Glucoseanalogons zeigte, erhalten, und es ist bekannt, dass dieser mutierter Stamm eine Mutation in dem malk-Gen hat, welches für das MalK-Protein codiert (Dean D. A. et al., Regulation of the Maltose Transport System of Escherichia coli by the Glucose-specific Enzyme III of the Phosphoenolpyruvate-Sugar Phosphotransferase System., J. Biol. Chem., 265 (34), 21005–21010, 1990; Kuhnau, S. et al., The Activities of the Escherichia coli MalK Protein in Maltose Transport and Regulation, and Inducer Exclusion Can Be Separated by Mutations, J. Bacteriol., 173 (7), 2180–2186, 1991).

[0007] Außerdem wurde für IIA^{Glc} ein mutierter Stamm berichtet, der ein mutiertes Protein enthält, welches eine verringerte Bindung mit Lactosepermease zeigt (Zeug, G. A. et al., Mutation analysis of the enzyme IIIGlc of the phosphoenolpyruvate phosphotransferase system in Escherichia coli. Res. Microbiol., 143, 251–261, 1992). Die Lactosepermease ist ein Enzym zur Aufnahme von Lactose, welche eines der Nicht-PTS-Saccharide ist.

[0008] Es ist jedoch nicht bekannt, ob die vorstehend genannten mutierten Stämme Maltose in Anwesenheit von Glucose gleichzeitig assimilieren.

Zusammenfassende Darstellung der Erfindung

[0009] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Assimilationsfähigkeit eines Mikroorganismus für Oligosaccharide, insbesondere Maltose, bei der Produktion einer L-Aminosäure durch Fermentation unter Verwendung des Mikroorganismus mit einer Kohlenstoffquelle, die Glucose und Oligosaccharide, wie Starkezersetzungslösungen, enthält, zu verbessern.

[0010] Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben eingehende Studien durchgeführt, um die vorstehend genannte Aufgabe zu lösen. Als Ergebnis haben sie gefunden, dass ein Mikroorganismus, bei dem die Wechselwirkung zwischen dem IIA^{Glc}-Protein von Glucose-PTS und einem Protein, das an der Nicht-PTS-Aufnahme von Maltose beteiligt ist, verringert oder ausgeschaltet wurde, Maltose selbst in Anwesenheit von Glucose assimilieren konnte, wodurch die vorliegende Erfindung gemacht wurde.

[0011] Das heißt, die vorliegende Erfindung stellt Folgendes bereit.

- (1) Ein Verfahren zur Herstellung einer L-Aminosäure unter Verwendung eines Mikroorganismus, welches das Kultivieren des Mikroorganismus in einem Medium unter Produktion und Anhäufung der L-Aminosäure in dem Medium und das Gewinnen der L-Aminosäure aus dem Medium umfasst, wobei der Mikroorganismus ein mutanter oder rekombinanter Stamm eines Mikroorganismus ist, worin die Maltoseassimilation durch die Wechselwirkung zwischen dem IIA^{Glc}-Protein von Glucose-PTS und dem MalK-Protein kontrolliert wird, die Wechselwirkung zwischen dem IIA^{Glc}-Protein und dem MalK-Protein des mutanten oder rekombinanten Stammes verringert oder ausgeschaltet ist, der Stamm Glucose und Maltose aufnehmen kann und das Medium Glucose und Oligosaccharide als Kohlenstoffquellen enthält.
- (2) Das Verfahren nach (1), wobei das Oligosaccharid Maltose ist.
- (3) Das Verfahren nach (1) oder (2), wobei die Wechselwirkung zwischen dem IIA^{Glc}-Protein von Glucose-PTS und MalK verringert oder ausgeschaltet ist, weil das in dem Mikroorganismus enthaltene MalK-Protein eine Mutation hat, die unter einer Mutation zum Substituieren eines Thr-Restes gegen den Ala-Rest an Position 124 und einer Mutation zum Substituieren eines Gln-Restes gegen den Leu-Rest an Position 327 ausgewählt ist.
- (4) Das Verfahren nach einem der Punkte (1) bis (3), wobei die Wechselwirkung zwischen dem IIA^{Glc}-Protein von Glucose-PTS und MalK verringert oder ausgeschaltet ist, weil das in dem Mikroorganismus enthaltene IIA^{Glc}-Protein eine Mutation hat, die unter einer Mutation zum Substituieren eines Ser-Restes gegen den Gly-Rest an Position 47 und einer Mutation zum Substituieren eines Thr-Restes gegen den Ala-Rest an Position 76 ausgewählt ist.
- (5) Das Verfahren nach einem der Punkte (1) bis (4), wobei die Zielsubstanz aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus L-Lysin, L-Threonin und L-Phenylalanin besteht.
- (6) Das Verfahren nach einem der Punkte (1) bis (5), wobei der Mikroorganismus ein Escherichia-Bakterium ist.

[0012] Erfindungsgemäß kann die Assimilationsfähigkeit eines Mikroorganismus für Oligosaccharide, insbesondere Maltose, bei der Herstellung einer L-Aminosäure durch Fermentation unter Verwendung des Mikroorganismus mit einer Kohlenstoffquelle, die Glucose und ein Oligosaccharid, beispielsweise eine Stärkezersetzungslösung, enthält, verbessert werden.

Kurze Erklärung der Zeichnungen

[0013] [Fig. 1](#) zeigt die Struktur des Plasmidvektors pTS1 mit einem temperaturempfindlichen Replikationsursprung.

[0014] [Fig. 2](#) zeigt das Wachstum von *E. coli* W3100(*tyrA*)*malK1* in einem Medium, das Glucose und Maltose enthält.

[0015] [Fig. 3](#) zeigt das Wachstum von *E. coli* W3100(*tyrA*)*crr3* in einem Medium, das Glucose und Maltose enthält.

[0016] [Fig. 4](#) zeigt das Wachstum von *E. coli* W3100(*tyrA*)*malK327* in einem Medium, das Glucose und Maltose enthält.

Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung

[0017] Im Folgenden wird die vorliegende Erfindung eingehend beschrieben.

[0018] Die Zielsubstanz, die durch den Mikroorganismus gemäß der vorliegenden Erfindung produziert wird, ist unter L-Aminosäuren, beispielsweise L-Threonin, L-Lysin, L-Glutaminsäure, L-Leucin, L-Isoleucin, L-Valin, L-Phenylalanin und dergleichen, ausgewählt. Besonders bevorzugte L-Aminosäuren sind L-Lysin, L-Threonin und L-Phenylalanin.

[0019] Der in der vorliegenden Erfindung eingesetzte Mikroorganismus ist ein Mikroorganismus, bei dem die Maltoseassimilation durch eine Wechselwirkung zwischen dem IIA^{Glc}-Protein von Glucose-PTS und einem Protein, das bei der Nicht-PTS-Aufnahme von Maltose beteiligt ist, kontrolliert wird. Genauer gesagt können Bakterien der Gruppe der Enterobakterien genannt werden, wie *Escherichia*-Bakterien, *Enterobacter*-Bakterien, und *Klebsiella*-Bakterien, coryneforme Bakterien, *Bacillus*-Bakterien, *Serratia*-Bakterien und dergleichen. Es handelt sich vorzugsweise um einen Mikroorganismus, der Gensubstitutionen erlaubt. Ob ein Mikroorganismus für die vorliegende Erfindung eingesetzt werden kann oder nicht, kann beispielsweise durch Beobachten des Wachstums eines Wildtypstammes des Mikroorganismus in einem Medium, das Glucose und Maltose als Kohlenstoffquellen enthält, und durch Feststellen, ob das Zweiphasenwachstum, die so genannte Diauxie, beobachtet wird oder nicht, bestimmt werden. Wenn Diauxie beobachtet wird, wird angenommen, dass die Maltoseassimilation durch eine Wechselwirkung des IIA^{Glc}-Proteins von Glucose-PTS und einem Protein, das an der Nicht-PTS-Aufnahme von Maltose beteiligt ist, kontrolliert wird.

[0020] Spezifische Beispiele von Mikroorganismen, die für die vorliegende Erfindung eingesetzt werden können, umfassen *Escherichia coli* AJ11442 (NRRL B-12185 und FERN BP-1543, vergleiche das US-Patent Nr. 4,346,170), *Brevibacterium lactofermentum* AJ3990 (ATCC31269, vergleiche das US-Patent Nr. 4,066,501) usw. für L-Lysin als Zielsubstanz, *Escherichia coli* VKPM B-3996 (RIA1867, vergleiche das US-Patent Nr. 5,175,107), *Corynebacterium acetoacidophilum* AJ12318 (PERM BP-1172, vergleiche das US-Patent Nr. 5,188,949) usw. für L-Threonin, *Escherichia coli* AJ12604 (FERN BP-3579, vergleiche die Europäische Patentveröffentlichung Nr. 488,424), *Brevibacterium lactofermentum* AJ12637 (FERN BP-4160, vergleiche die Französische Patentveröffentlichung Nr. 2,686,898) usw. für L-Phenylalanin, *Escherichia coli* AJ12624 (FERM BP-3853, vergleiche die Französische Patentveröffentlichung Nr. 2,680,178), *Brevibacterium lactofermentum* AJ12475 (FERMBP-2922, vergleiche das US-Patent Nr. 5,272,067) und dergleichen für L-Glutaminsäure, *Escherichia coli* AJ11478 (FERM P-5274, vergleiche die Japanische Patentveröffentlichung (Kokoku) Nr. 62-34397), *Brevibacterium lactofermentum* AJ3718 (FERM P-2516, vergleiche das US-Patent Nr. 3,970,519) usw. für L-Leucin, *Escherichia coli* KX141 (VKPM B-4781, vergleiche die Europäische Patentveröffentlichung Nr. 519,113), *Brevibacterium flavum* AJ12149 (FERM BP-759, vergleiche das US-Patent Nr. 4,656,135) usw. für L-Isoleucin, *Escherichia coli* VL1970 (VKPM B-4411, vergleiche die Europäische Patentveröffentlichung Nr. 519,113), *Brevibacterium lactofermentum* AJ12341 (FERM BP-1763, vergleiche das US-Patent Nr. 5,188,948) usw. für L-Valin und dergleichen.

[0021] Außerdem können, wenn die Zielsubstanz L-Lysin, L-Threonin oder L-Phenylalanin ist, Stämme, die durch Einführen eines Plasmids pVIC40, pCABD2 oder pMGAL1, die mit einem Gen, das bei der Produktion jeder der Aminosäuren beteiligt ist, in *E. coli* W3100 (*tyrA*) erhalten werden, auch in geeigneter Weise eingesetzt werden, wobei diese in den nachstehenden Beispielen beschrieben werden.

[0022] Außerdem kann in den Mikroorganismen, die für die vorliegende Erfindung eingesetzt werden, die Aktivität eines Proteins, das an der Produktion der Zielsubstanz beteiligt ist, verstärkt werden, oder die Aktivität eines Proteins, das an der Zersetzung oder dergleichen der Zielsubstanz beteiligt ist, kann in Abhängigkeit von der Zielsubstanz verringert werden.

[0023] Der für die vorliegende Erfindung eingesetzte Mikroorganismus ist ein mutierter oder rekombinanter Stamm, der aus einem vorstehend beschriebenen Mikroorganismus als Ausgangsstamm erhalten wird, wobei die Wechselwirkung zwischen dem IIA^{Glc}-Protein von Glucose-PTS und einem Protein, das an der Nicht-PTS-Aufnahme von Maltose beteiligt ist, verringert oder eliminiert ist, es ist jedoch ein Mikroorganismus, der Glucose und Maltose aufnehmen kann. Das heißt, in der vorliegenden Erfindung enthalten das IIA^{Glc}-Protein und das Protein, das an der Nicht-PTS-Aufnahme von Maltose beteiligt ist, eine Mutation, welche die Aufnahme von Glucose und Maltose im Wesentlichen nicht beeinflusst, obwohl sie die Wechselwirkung zwischen ihnen verringert oder ausschaltet.

[0024] In *Escherichia coli* wird das IIA^{Glc}-Protein von dem *crr*-Gen codiert. Außerdem kann als Protein, das an der Nicht-PTS-Aufnahme von Maltose beteiligt ist, das *Malk*-Protein genannt werden, welches von dem *malk*-Gen in *Escherichia coli* codiert wird.

[0025] Um die Wechselwirkung des IIA^{Glc}-Proteins und des Proteins, das an der Nicht-PTS-Aufnahme von Maltose beteiligt ist, zu verringern oder auszuschalten, kann eine Mutation, welche die Wechselwirkung zwischen diesen Proteinen verringert oder ausschaltet, in eines oder beide der Gene, die für diese Proteine codieren, eingeführt werden.

[0026] Ein *crr*-Gen oder *malk*-Gen, das eine vorstehend genannte Mutation aufweist, kann beispielsweise durch Isolieren des *crr*-Gens oder des *malk*-Gens aus einem mutierten Stamm, der in einem Medium, das Maltose als Kohlenstoffquelle und ein Glucoseanalogon, wie 2-Deoxyglucose, enthält, wachsen kann, erhalten werden. Als mutiertes *malk*-Gen, das wie vorstehend beschrieben erhalten werden kann, ist ein mutiertes *malk*-Gen mit einer Mutation zur Substitution eines Thr-Restes gegen den Ala-Rest 124 des codierten *Malk*-Proteins bekannt (Dean, D. A. et al., J. Biol. Chem., 265 (34), 21005–21010, 1990; Kuhnau, S. et al., J. Bacteriol., 173 (7), 2180–2186, 1991). Außerdem kann ein mutiertes *malk*-Gen, das für ein *Malk*-Protein codiert und eine Mutation aufweist, bei der ein Gln-Rest gegen den Leu-Rest in Position 327 ausgetauscht ist (L327Q-Typ Mutation), welche durch die Erfinder der vorliegenden Erfindung erhalten wurde, für die vorliegende Erfindung ebenfalls eingesetzt werden. Außerdem kann ein mutiertes *malk*-Gen, das für ein mutiertes *Malk*-Protein codiert, das sowohl eine Mutation, bei der ein Thr-Rest gegen den Ala-Rest in Position 124 ausgetauscht ist, als auch eine Mutation aufweist, bei der ein Gln-Rest gegen den Leu-Rest in Position 327 ausgetauscht ist, für die vorliegende Erfindung ebenfalls verwendet werden.

[0027] Andererseits ist ein Beispiel des mutierten *crr*-Gens ein *crr*-Gen, das eine Mutation, bei der ein Ser-Rest gegen den Gly-Rest in Position 47 des codierten IIA^{Glc}-Proteins ausgetauscht ist, eine Mutation, bei der ein Thr-Rest gegen den Ala-Rest in Position 76 ausgetauscht ist, oder beide dieser Mutationen enthält.

[0028] Die Positionen der vorstehend genannten Mutationen werden von dem Met-Rest, welcher dem Initiationscodon entspricht, das als erstes Codon angenommen wird, nummeriert. Zusätzlich können das *malk*-Gen oder das *crr*-Gen eine oder mehrere Mutationen enthalten, welche keine erfindungsgemäßen Mutationen sind, sodass Deletionen, Substitutionen oder Insertionen eines oder mehrerer Aminosäurereste in dem codierten *Malk*-Protein oder IIA^{Glc}-Protein auftreten können. Es können selbst solche *malk*-Gene oder *crr*-Gene für die vorliegende Erfindung eingesetzt werden, solange die Wechselwirkung zwischen dem *Malk*-Protein und dem IIA^{Glc}-Protein verringert oder ausgeschaltet ist und die Aufnahme von Glucose und Maltose im Wesentlichen nicht beeinträchtigt wird. Wenn das *Malk*-Protein oder das IIA^{Glc}-Protein eine Deletion oder Insertion eines oder mehrerer Aminosäurereste aufweist, sollten sich die Positionen der vorstehend genannten Mutationen verändern. Wenn beispielsweise das *Malk*-Protein eine Deletion eines Aminosäurerestes auf der N-terminalen Seite des Leu-Restes in Position 327 aufweist, sollte der Leu-Rest 327 die Position 326 bekommen. Auch in einem solchen Fall entspricht der Leu-Rest in Position 326 dem Leu-Rest in Position 327 eines Wildtypproteins. Deshalb sollen in der vorliegenden Beschreibung die Positionen der Mutationen Positionen darstellen, welche den Positionen in einem Wildtypgen oder einem Wildtypprotein entsprechen.

[0029] Als Verfahren zum Einführen der vorstehend genannten Mutationen in das *malk*-Gen und/oder das *crr*-Gen kann ein Verfahren zum Einführen einer Zielmutation in das *malk*-Gen und/oder *crr*-Gen durch ortsspezifische Mutagenese oder dergleichen, wobei ein mutiertes Gen erhalten wird, und das Substituieren des

erhaltenen mutierten Gens gegen das malK-Gen und/oder crr-Gen auf einem Chromosom des Mikroorganismus durch Gensubstitution unter Einsatz der homologen Rekombination genannt werden.

[0030] Eine solche Gensubstitution kann beispielsweise auf dieselbe Weise wie die Gensubstitution unter Verwendung des nachstehend beschriebenen temperaturempfindlichen Plasmids durchgeführt werden. Beispiele der temperatursensitiven Plasmide von *Escherichia coli* umfassen pMAN031 (J. Bacteriol., 162, 1196, 1985), pMAN997 (WO 99/03988) und dergleichen. Diese Plasmide können in *Escherichia coli* zumindest bei 30°C autonom replizieren, sie können jedoch bei 37–42°C nicht autonom replizieren.

[0031] Außerdem kann ein mutierter Stamm mit einer Zielmutation in dem malK-Gen und/oder crr-Gen auch durch Behandeln eines Mikroorganismus durch UV-Bestrahlung oder mit einem Mutagenisierungsmittel, das für eine übliche Mutagenisierungsbehandlung eingesetzt wird, wie N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG) oder salpetrige Säure, und Selektieren eines Stammes, der in einem Medium wachsen kann, welches ein Glucoseanalogon, wie 2-Deoxyglucose, enthält, erhalten werden.

[0032] Ob ein erhaltener Kandidatenstamm ein Zielmutantenstamm ist oder nicht, kann durch Isolieren des malK-Gens oder des crr-Gens aus dem Kandidatenstamm und Untersuchen seiner Nucleotidsequenz um die Mutationsstelle herum bestätigt werden.

[0033] Als Medium, das für die Kultivierung des erfindungsgemäßen Stammes eingesetzt wird, können herkömmlicherweise eingesetzte gut bekannte Medien in Abhängigkeit von der Art des zu verwendenden Mikroorganismus eingesetzt werden. Das heißt, übliche Medien, die eine Kohlenstoffquelle, Stickstoffquelle, anorganische Ionen und andere organische Komponenten, je nach Bedarf, enthalten, können eingesetzt werden. Es ist jedoch bevorzugt, ein Medium einzusetzen, das Glucose und ein Oligosaccharid, wie Maltose, als Kohlenstoffquellen enthält.

[0034] Als Kohlenstoffquelle, die nicht Glucose und Maltose ist, können Zucker, wie Lactose, Galactose und Stärkehydrolysat, Alkohole, wie Glycerin und Sorbitol, organische Säuren, wie Fumarsäure, Citronensäure und Bernsteinsäure, und dergleichen eingesetzt werden.

[0035] Als Stickstoffquelle können anorganische Ammoniumsalze, wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid und Ammoniumphosphat, organischer Stickstoff, wie Sojabohnenhydrolysat, Ammoniakgas, wässriges Ammoniak und dergleichen eingesetzt werden.

[0036] Als organische Spurennährstoffquellen können geeignete Mengen der erforderlichen Substanzen, wie Vitamin B₁, L-Homoserin und L-Tyrosin, Hefeextrakt und dergleichen vorzugsweise enthalten sein. Zusätzlich zu diesen werden nach Bedarf kleine Mengen von Kaliumphosphat, Magnesiumsulfat, Eisenionen, Manganionen und dergleichen zugegeben.

[0037] Die Kultivierung kann unter bekannten Bedingungen durchgeführt werden, die herkömmlicherweise in Abhängigkeit von dem einzusetzenden Mikroorganismus eingesetzt werden. Beispielsweise wird die Kultivierung vorzugsweise unter aeroben Bedingungen während 16–120 Stunden durchgeführt. Die Kultivierungstemperatur wird auf 25–45°C kontrolliert, und der pH-Wert wird während der Kultivierung auf 5–8 kontrolliert. Anorganische oder organische saure oder alkalische Substanzen sowie Ammoniakgas und dergleichen können für die pH-Werteinstellung verwendet werden.

[0038] Um eine L-Aminosäure aus einem Medium nach Beendigung der Kultivierung zu gewinnen ist erfindungsgemäß kein spezielles Verfahren erforderlich. Das heißt, die Gewinnung einer L-Aminosäure kann durch eine Kombination bekannter Verfahren durchgeführt werden, beispielsweise solche unter Verwendung eines Ionenaustauscherharzes, Ausfällung und dergleichen.

Beste Ausführungsform der Erfindung

[0039] Im Folgenden wird die vorliegende Erfindung anhand der folgenden Beispiele genauer erklärt. Die in den folgenden Beispielen verwendeten Reagenzien wurden von Wako Pure Chemicals oder Nakarai Tesque bezogen, wenn nichts anderes angegeben ist. Die Zusammensetzungen der in jedem Beispiel verwendeten Medien sind nachstehend gezeigt.

[L-Medium]

Bactotryptonpepton (DIFCO)	10 g/l
Hefeextrakt (DIFCO)	5 g/l
NaCl	5 g/l

[0040] Es wurde 20 Minuten bei 120°C autoklaviert.

[L-Agarmedium]

L-Medium	
Bactoagar (DIFCO)	15 g/l

[0041] Es wurde 20 Minuten bei 120°C Dampf sterilisiert.

[SOC-Medium]

Bactotryptonpepton (DIFCO)	20 g/l
Hefeextrakt (DIFCO)	5 g/l

10 mM NaCl
 2,5 mM KCl
 10 mM MgSO₄
 10 mM MgCl₂
 20 mM Glucose

[0042] Die Komponenten, ausgenommen die Magnesiumlösung und Glucose, wurden autoklaviert (120°C, 20 Minuten), dann mit 2 M Magnesiumstammlösung (1 M MgSO₄, 1 M MgCl₂) und 2 M Glucoselösung versetzt, wobei diese Lösungen vorher durch einen 0,22 µm Filter und dann nochmals durch einen 0,22 µm Filter filtriert worden waren.

[M9-Minimalmedium]

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	80 g/l
KH ₂ PO ₄	15 g/l
NaCl	2,5 g/l
NH ₄ Cl	5 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246,48 mg/l
Saccharid (Glucose oder Maltose oder Gemisch dieser beiden bei einem geeigneten Verhältnis)	5 g/l
pH 7,0	

[0043] MgSO₄ und Glucose wurden getrennt voneinander sterilisiert (120°C, 20 Minuten) und zugegeben. Eine geeignete Menge an Aminosäuren und Vitaminen wurden nach Bedarf zugegeben. Der pH-Wert wurde mit NaOH eingestellt.

[M9-Minimalagarmedium]

M9-Minimalmedium	
Bactoagar (DIFCO)	15 g/l

[Aminosäureproduktionsmedium]

(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g/l
KH ₂ PO ₄	1 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10 g/l
MnSO ₄ ·4H ₂ O	10 g/l
Hefeextrakt (DIFCO)	2 g/l
Saccharid (Glucose oder Maltose oder Gemisch dieser beiden bei einem geeigneten Verhältnis)	40 g/l
L-Tyrosin	100 g/l
CaCO ₃ (Japanisches Arzneibuch)	30 g/l
Streptomycin	50 mg/l

[0044] Das Saccharid, MgSO₄·7H₂O und Streptomycin wurden getrennt voneinander sterilisiert. Die anderen Komponenten wurden gemischt, mit KOH auf einen pH-Wert von 7,0 eingestrichen und 10 Minuten bei 115°C autoklaviert. CaCO₃ wurde 2 Tage bei 180°C einer Trockensterilisation unterzogen. Streptomycin wurde durch Filtration sterilisiert.

Beispiel 1: Einführung einer Mutation in das malk-Gen und
Bestätigung der Verbesserung der Maltoseassimilationseigenschaft

[0045] Eine Kolonie von E. coli W3100 wurde in 5 ml L-Medium eingepflegt und über Nacht unter Schütteln kultiviert. Aus den erhaltenen Zellen wurde die chromosomale DNA unter Einsatz eines Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) präpariert. Die PCR wurde unter Verwendung der vorstehenden chromosomalen DNA als Matrize und den nachstehend gezeigten Primern durchgeführt.

[Primer 1]

5'-GGCGGTAATGTGGAGATGCGCACATAAAATCGCC-3' (SEQ ID NR: 1)

[Primer 2]

5'-CCTGAGTCATTGCTTTTCTTTTTCACATCACCTGTGAC-3' (SEQ ID NR: 2)

[0046] Die PCR wurde unter Verwendung von Pyrobest DNA-Polymerase, hergestellt von Takara Shuzo, und gemäß der dem Enzym beigefügten Anweisung durchgeführt. Nach dem vollständigen Ablauf der Reaktion wurde das Amplifikationsprodukt unter Verwendung eines BKL-Kit, hergestellt von Takara Shuzo, abgestumpft und phosphoryliert. Das amplifizierte Fragment wurde unter Verwendung des Ligation Kit ver.2 (Takara Shuzo) an pSTV28 (Takara Shuzo), der mit einem Restriktionsenzym Sma I (Takara Shuzo) und dann dephosphoryliert worden war, ligiert. Dieses Ligationsreaktionsgemisch wurde nach dem Verfahren von Hanahan et al. in E. coli JM109 transformiert (Hanahan, D., Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids, J. Mol. Biol., 166, 557-580, 1983). Die Auswahl der Transformanten wurde auf einem L-Agarmedium durchgeführt, welches 50 µg/ml Chloramphenicol (Cm), 0,2 mM IPTG (Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid) und 40 µg/ml X-gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid) enthält. Aus den Transformanten wurde auf herkömmliche Weise ein Plasmid extrahiert, und die Nucleotidsequenz des eingefügten Fragments wurde bestimmt, um zu bestätigen, dass das malk-Gen in die SmaI-Schnittstelle von pSTV28 eingeführt worden war. Das Plasmid wurde pSTVmaLK genannt.

[0047] Die Nucleotidsubstitution des malk-Gens auf pSTVmaLK wurde wie folgt durchgeführt. Es wurde beschlossen, die Substitution von A gegen G in der Position 370 (Substitution von Thr gegen den Ala-Rest in Position 124 des MaLK-Proteins) einzuführen. Die Positionen in den Nucleotidsequenzen, die hier verwendet werden, werden von dem A des Initiationscodons ATG an nummeriert, welches als das erste Nucleotid angenommen wurde, und die Positionen der Aminosäurereste werden von dem Met-Rest, welcher dem Initiationscodon entspricht und als die erste Aminosäure angenommen wurde, nummeriert.

[0048] Zunächst wurde die Substitution des Nucleotids auf dem Plasmid unter Verwendung von QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE) durchgeführt. Die Sequenzen der für das Einführen der malK-Mutation eingesetzten Primer sind wie folgt.

[Primer 3]

5'-CGGAAGTGCTACAACGACGCATTTGCTGGATCGC-3' (SEQ ID NR: 3)

[Primer 4]

5'-GCGATCCAGCAAATGCGTCAGTTGTAGCACTTCCG-3' (SEQ ID NR: 4)

[0049] Die Einführung der Mutation wurde durch Bestimmung der Nucleotidsequenz der betroffenen Stelle gemäß der dem Kit beigefügten Anweisung bestätigt. Das produzierte Plasmid wurde pSTVmalK-A124T genannt. Das Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII (beide von Takara Shuzo) verdaut und an dieselben Restriktionsenzymststellen eines Plasmidvektors pTS1 mit einem temperaturempfindlichen Replikationsursprung ligiert.

[0050] pTS1 wurde durch Austauschen der Pst-I-Hind-III-Fragmente von pMAN031 (Matsuyama, S. und Mizushima S., Construction and characterization of a deletion mutation lacking micF, a proposed regulatory gene for OmpF synthesis in Escherichia coli., J. Bacteriol., 162 (3), 1196–1202, 1985) und pBR322 (von Takara Shuzo) erhalten ([Fig. 1](#)). Das hergestellte Plasmid wurde pTSmalK-A124T genannt.

[0051] Die homologe Rekombination des malK-Gens mit malK auf dem Chromosom von E. coli W3100 (tyrA) (vergleiche die Europäische Patentveröffentlichung Nr. 488,424) gemäß einem üblichen Verfahren für die homologe Rekombination (Matsuyama, S. und Mizushima, S., J. Bacteriol., 162(3), 1196–1202, 1985) wurde unter Ausnutzung der Temperaturempfindlichkeit des vorstehend genannten Plasmids pTSmalK-A124T durchgeführt.

[0052] Kurz gesagt wurde E. coli W3100 (tyrA) nach dem Verfahren von Hanahan et al. (J. Mol. Biol., 166, 557–580) unter Verwendung von pTSmalK-A124T transformiert. Eine Kolonie, die nach der Kultivierung bei 30°C auftrat, wurde in 5 ml eines L-Mediums, das 50 µg/ml Ampicillin enthielt, in einem Teströhrchen eingepflegt und bei 30°C über Nacht unter Schütteln kultiviert. Die Kulturbrühe wurde 10³- bis 10⁹-fach verdünnt, und 0,1 ml der Verdünnung wurde auf L-Agarmedium, das 50 µg/ml Ampicillin enthielt, aufgetragen und über Nacht bei 42°C kultiviert. Eine auftretende Kolonie wurde in 5 ml L-Medium in einem Teströhrchen eingepflegt und über Nacht bei 30°C unter Schütteln kultiviert. Diese Kulturbrühe in einem Volumen von 0,1 ml wurde in 5 ml L-Medium in einem Teströhrchen eingepflegt und bei 37–42°C während 3–4 Stunden unter Schütteln kultiviert. Diese Kulturbrühe wurde 10³- bis 10⁷-fach verdünnt, und 0,1 ml der Verdünnung wurde auf L-Agarmedium aufgetragen und über Nacht bei 37–42°C kultiviert. Die Ampicillinempfindlichkeit einer auftretenden Kolonie wurde bestätigt.

[0053] Der Mutationspunkt des mit dem Zielgen substituierten Stammes wurde wie folgt bestätigt. Eine PCR wurde unter Einsatz der vorstehend genannten Kolonie als Matrize und Pyrobest-DNA-Polymerase durchgeführt. Primer 1 und Primer 2 wurden als Primer eingesetzt, und die PCR wurde nach der dem Enzym beigefügten Anweisung durchgeführt. Nach dem vollständigen Ablauf der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch einer Gelfiltration unterworfen, um die restlichen Primer aus dem Reaktionsgemisch zu entfernen. Die verwendete Säule war MicroSpin™ S-400HR (hergestellt von Amersham Pharmacia Biotech), und es wurde das Verfahren gemäß der der Säule beigefügten Anweisung durchgeführt. Das erhaltene PCR-Produkt war ein mutiertes malK-Gen des malK-Gen-substituierten Stammes. Die Nucleotidsequenz dieses Gens wurde hauptsächlich in dem Bereich bestimmt, welcher den Mutationspunkt enthielt. Es wurde bestätigt, dass der mutierte Stamm die gewünschte Mutation in dem malK-Gen enthielt. Der Stamm wurde E. coli W3100 (tyrA)malK1 genannt.

[0054] Das Wachstum von E. coli W3100 (tyrA)malK1 in einem Medium, das aus M9-Medium bestand, dem 0,05% Glucose und 0,45% Maltose beigefügt war, wurde durch OD-Messung überwacht ([Fig. 2](#)). E. coli W3100 (tyrA) wurde als Kontrolle verwendet. Aus den in [Fig. 2](#) gezeigten Ergebnissen geht hervor, dass obwohl das Zweiphasenwachstum, das heißt die so genannte Diauxie, für E. coli W3100 (tyrA) beobachtet wurde, ein solches Zweiphasenwachstum für den Stamm mit der eingeführten malK-Mutation, E. coli W3100 (tyrA)malK1, nicht beobachtet wurde. Es wurde also gefunden, dass aufgrund der Einführung der malK-Mutation der Induktorausschluss nicht verursacht wurde und Maltose gleichzeitig mit der Glucoseassimilation assimiliert wurde.

Beispiel 2: Einführen einer Mutation in das crr-Gen und
Bestätigung der Verbesserung der Maltoseassimilationseigenschaft

[0055] In diesem Beispiel wurde entschieden, eine Mutation in das crr-Gen einzuführen, um die Wechselwirkung zwischen dem MalK-Protein und dem crr-Genprodukt IIA^{Glc} zu verringern.

[0056] Eine Kolonie von *E. coli* W3100 wurde in 5 ml L-Medium eingepflegt und über Nacht unter Schütteln kultiviert. Aus den erhaltenen Zellen wurde chromosomale DNA unter Einsatz des Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) hergestellt. Die PCR wurde unter Verwendung der vorstehend genannten chromosomalen DNA als Matrize und den folgenden Primern durchgeführt.

[Primer 5]

5' -GATTTCTTTAGTATCGGCACCAATGATTTAACGC-3' (SEQ ID NR: 5)

[Primer 6]

5' -AAATTGCCGCGATCTAGACAGTGCCATTGC-3' (SEQ ID NR: 6)

[0057] Die PCR wurde unter Einsatz der Pyrobest DNA Polymerase, hergestellt von Takara Shuzo, gemäß der dem Enzym beigefügten Anweisung durchgeführt. Nach dem vollständigen Ablauf der Reaktion wurde das Amplifikationsprodukt in dem Reaktionsgemisch abgestumpft und unter Verwendung des BKL-Kits von Takara Shuzo phosphoryliert. Das erhaltene amplifizierte Fragment wurde unter Verwendung des Ligation Kit ver.2 (Takara Shuzo) an pMW219 (Nippon Gene) ligiert, das mit einem Restriktionsenzym SmaI (Takara Shuzo) behandelt und dann dephosphoryliert wurde. *E. coli* JM109 wurde mit diesem Ligationsreaktionsgemisch gemäß dem Verfahren von Hanahan et al. transformiert. Die Selektion der Transformanten wurde auf einem L-Agarmedium durchgeführt, das 25 µg/ml Kanamycin (Km), 0,2 mM IPTG (Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid) und 40 µg/ml X-gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid) enthielt. Aus den Transformanten wurde ein Plasmid auf herkömmliche Weise extrahiert, und die Nucleotidsequenz des eingeführten Fragments wurde bestimmt, um zu bestätigen, dass das crr-Gen in die Sma-I-Stelle von pMW219 eingeführt worden war. Dieses Plasmid wurde pMWcrr genannt.

[0058] Die Nucleotidsubstitution des crr-Gens auf pMWcrr wurde wie folgt durchgeführt. Es wurde entschieden, die Nucleotidsubstitution von A gegen G in der Position 226 einzuführen (Substitution von Thr gegen den Ala-Rest in Position 76, Zeng, G. A. et al., Mutational analysis of the enzyme III^{Glc} des Phosphoenolpyruvatphosphotransferasesystems in *Escherichia coli*, Res. Microbiol., 143, 252–261, 1992). Die Positionen in den DNA-Nucleotidsequenzen, die hier verwendet werden, sind von dem A des Initiationscodons ATG, welches als das erste Nucleotid genommen wurde, aus nummeriert, und die Positionen der Aminosäurereste sind von dem Met-Rest, welcher dem vorstehend genannten Initiationscodon entspricht und als der erste Aminosäurerest angenommen wurde, aus nummeriert.

[0059] Zuerst wurde die Substitution des Nucleotids auf dem Plasmid unter Verwendung von QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE) durchgeführt. Die Sequenzen der für die Einführung der crr-Mutation eingesetzten Primer sind nachstehend gezeigt.

[Primer 7]

5' -GAAACCAACCACACATTCTCTATCGAATCTGATAGCGGCG-3' (SEQ ID NR: 7)

[Primer 8]

5' -CGCCGCTATCAGATTCGATAGAGAATGTGTGGTTGGTTTC-3' (SEQ ID NR: 8)

[0060] Die Einführung der Mutation wurde durch Bestimmen der Nucleotidsequenz der betreffenden Stelle gemäß der dem vorstehend genannten Kit beigefügten Anweisung bestätigt. Das hergestellte Plasmid wurde pMWcrr-A76T genannt. Das Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen EcoR I und Xba I (beide von Takara Shuzo) verdaut und zwischen dieselben Restriktionsenzymststellen des Plasmidvektors pMAN997 (vergleiche die Internationale Patentveröffentlichung Nr. WO 99/03988) mit einem temperaturempfindlichen Replikationsursprung ligiert.

[0061] Das hergestellte Plasmid wurde pMANcrr-A76T genannt. Die homologe Rekombination wurde für das crr-Gen auf dem Chromosom von *E. coli* W3100 (tyrA) unter Verwendung dieses Plasmids durch dasselbe Verfahren wie bei der Herstellung des malK-Mutantenstammes durchgeführt, und auf diese Weise wurde ein Stamm erhalten, in den eine Mutation in dem crr-Gen eingeführt worden war.

[0062] Die Mutationsstelle in dem Stamm mit dem substituierten Zielgen wurde auf dieselbe Weise wie bei dem malK-Mutantenstamm bestätigt. Die PCR wurde unter Einsatz einer Ampicillinresistenten Kolonie als Matrize und Ex Taq Polymerase (hergestellt von Takara Shuzo) durchgeführt. Primer 5 und Primer 6 wurden als die Primer verwendet, und die PCR wurde gemäß der dem Enzym beigefügten Anweisung durchgeführt. Nach dem vollständigen Ablauf der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch einer Gelfiltration unterworfen, um die restlichen Primer in dem Reaktionsgemisch zu entfernen. Die verwendete Säule war MicroSpin™ S-400HR (hergestellt von Amersham Pharmacia Biotech), und das Verfahren wurde gemäß der der Säule beigefügten Anweisung durchgeführt. Das erhaltene PCR-Produkt war ein mutiertes crr-Gen des Stammes mit dem substituierten crr-Gen. Die Nucleotidsequenz dieses Gens wurde hauptsächlich für die Region, welche die Mutationsstelle enthielt, bestimmt. Der mutierte Stamm, für den bestätigt wurde, dass die vorstehend beschriebene gewünschte Mutation eingeführt worden war, wurde *E. coli* W3100 (tyrA)crr3 genannt.

[0063] Das Wachstum von *E. coli* W3100 (tyrA)crr3 in einem Medium, das aus M9-Medium, versetzt mit 0,05% Glucose und 0,45% Maltose, bestand, wurde durch OD-Messung überwacht (**Fig. 3**). *E. coli* W3100 (tyrA) wurde als Kontrolle verwendet. **Fig. 3** zeigt, dass obwohl ein Zweiphasenwachstum, das heißt die so genannte Diauxie, für *E. coli* W3100 (tyrA) beobachtet wurde, ein solches Zweiphasenwachstum für den Stamm *E. coli* W3100 (tyrA)crr3, in den die crr-Mutation eingeführt worden war, nicht beobachtet wurde. Das heißt, es wurde gefunden, dass aufgrund der Einführung der crr-Mutation der Induktorausschluss nicht verursacht wurde und Maltose gleichzeitig mit der Glucoseassimilation assimiliert wurde. Dasselbe wurde beobachtet, wenn die Nucleotidsubstitution von A gegen G in Position 139 (Substitution von Ser gegen Gly in Position 47) eingeführt wurde.

Beispiel 3: Herstellung eines Glucoseanalogon-resistenten Stammes, Identifikation der Mutationsstelle des resistenten Stammes und Einführen der Mutation in *E. coli* W3100 (tyrA)

[0064] Eine Kolonie von *E. coli* W3100 (tyrA) wurde in 5 ml eines L-Mediums in einem Teströhrchen eingepflanzt und über Nacht unter Schütteln kultiviert. Die kultivierten Zellen wurden zweimal mit 5 ml physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und in demselben Volumen einer physiologischen Kochsalzlösung suspendiert. Diese Suspension wurde in einer Menge von 0,1 ml auf M9-Agarmedium, welches Maltose als Kohlenstoffquelle enthielt, aufgetragen, und die Oberfläche wurde getrocknet. Eine Impföse mit 2-Deoxyglucose wurde auf die Platte gegeben, und die Zellen wurden bei 37°C während zwei oder drei Tagen kultiviert. *E. coli* W3100 (tyrA) kann Maltose als Kohlenstoffquelle nutzen, wenn jedoch ein Glucoseanalogon, wie 2-Deoxyglucose, vorhanden ist, leidet dieser Stamm an der Repression und kann nicht mehr wachsen. In diesem Fall wird um den Punkt, auf den das Glucoseanalogon als Zentrum gegeben worden ist, ein Wachstumsinhibitionskreis gebildet. Wenn die Kultivierung während zwei oder drei Tagen durchgeführt wird, treten Kolonien, die wachsen können, in dem Inhibitionskreis mit einer bestimmten Häufigkeit auf. Glucoseanalogon-resistente Stämme wurden anhand dieses Phänomens erhalten.

[0065] Die Mutation des malK-Gens von malK#1 und malK#2 wurde unter den Glucoseanalogon-resistenten Stämmen untersucht. Die Mutationsstellen wurden wie folgt bestätigt. Eine Kolonie jedes Stammes wurde gebildet, und die PCR wurde unter Verwendung der Kolonie als Matrize und von Pyrobest DNA Polymerase durchgeführt. PCR wurde unter Verwendung von Primer 1 und Primer 2 als Primer gemäß der dem Enzym beigefügten Anweisung durchgeführt. Nach dem vollständigen Ablauf der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch einer Gelfiltration unterworfen, um die restlichen Primer in dem Reaktionsgemisch zu entfernen. Die verwendete Säule war MicroSpin™ S-400HR (hergestellt von Amersham Pharmacia Biotech), und das Verfahren wurde gemäß der der Säule beigefügten Anweisung durchgeführt. Die erhaltenen PCR-Produkte waren malK-Gene des Glucose-resistenten Stammes malK#1 und malK#2, und die Nucleotidsequenzen dieser Gene wurden bestimmt. In beiden Stämmen wurde eine Substitution gegen T in Position 980 und entsprechend eine Substitution von Gln gegen Leu in Position 327 gefunden. Dies ist eine bislang unbekannte Mutation. Die Mutation wurde L327Q-Mutation bezeichnet.

[0066] Die L327Q-Mutation wurde in *E. coli* W3100 (tyrA) durch das vorstehend beschriebene Verfahren eingeführt. Der erhaltene Stamm mit eingeführter Mutation wurde *E. coli* W3100 (tyrA)malK327 genannt. Auf ähnliche Weise wurde das Wachstum von *E. coli* W3100 (tyrA)malK327 in einem Medium, das aus M9-Medium, versetzt mit 0,05% Glucose und 0,45% Maltose, bestand, durch OD-Messung überwacht (**Fig. 4**). *E. coli*

W3100 (tyrA) wurde als Kontrolle verwendet. [Fig. 4](#) zeigt, dass obwohl ein Zweiphasenwachstum, das heißt die so genannte Diauxie, für E. coli W3100 (tyrA) beobachtet wurde, ein solches Zweiphasenwachstum für den Stamm E. coli W3100 (tyrA)malk327 mit eingeführter malk-Mutation nicht beobachtet wurde. Es wurde also gefunden, dass aufgrund der Einführung der neuen malk-Mutation der Induktorausschluss nicht bewirkt wurde und Maltose gleichzeitig mit der Glucoseassimilation assimiliert wurde.

Beispiel 4: Untersuchung der L-Aminosäureproduktion von malk-Mutantenstämmen

[0067] pVIC40 (WO 90/04636), pCABD2 (WO 95/16042) und pMGAL1 (offen gelegte Japanische Patentanmeldung (Kokai) Nr. 5-344881) wurden in E. coli W3100 (tyrA)malk327 eingeführt, und die Fähigkeit jedes Stammes, L-Lysin, L-Threonin und L-Phenylalanin zu produzieren, wurde untersucht.

[0068] Das Plasmid pVIC40 enthält das Threoninoperon und kann aus E. coli VKPM B-3996 (hinterlegt bei dem Antibiotika-Forschungsinstitut der UDSSR (VNIIA) unter der Nummer RIA1867), der das Plasmid trägt (WO 90/04636), hergestellt werden.

[0069] Das Plasmid pCABD2 enthält DNA (dapA-24), die für Dihydrodipicolinatsynthase (DDPS), die von Escherichia coli abgeleitet ist und eine Mutation zur Ausschaltung der Rückkopplungshemmung durch L-Lysin trägt, eine DNA (lysC-80), die für von Escherichia coli abgeleitete Aspartokinase III mit einer Mutation zur Ausschaltung der Rückkopplungshemmung durch L-Lysin codiert, eine DNA (dapB), die für Dihydrodipicolinat-reduktase aus Escherichia coli codiert, und eine DNA (ddh), die für eine Diaminopimelatdehydrogenase aus Brevibacterium lactofermentum (WO 95/16042) codiert.

[0070] Das Plasmid pMGAL1 enthält ein Gen, das für 3-Deoxy-D-arabinohepturonat-7-phosphatsynthase aus einem Escherichia-Bakterium mit ausgeschalteter Rückkopplungshemmung codiert, und ein Gen, das für Chorismatmutaseprephenatdehydratase aus Escherichia coli mit ausgeschalteter Rückkopplungshemmung codiert (offen gelegte Japanische Patentanmeldung Nr. 5-344881).

[0071] E. coli W3100 (tyrA)malk327 wurde mit jedem Plasmid gemäß den Verfahren von Hanahan et al. transformiert. Jede erhaltene Transformante wurde in 5 ml eines L-Mediums, das 50 µg/ml Streptomycin enthielt, eingepflegt und über Nacht bei 37°C unter Schütteln kultiviert. Dann wurde die Kulturbrühe in einer Menge von 50 µl auf L-Agarmedium, das 50 µg/ml Streptomycin enthielt, aufgetragen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Ein Aminosäureproduktionsmedium, das ein Gemisch von Glucose und Maltose (36 g/l Glucose, 5,8 g/l Maltose) als Kohlenstoffquelle enthielt, wurde in einem Volumen von 20 ml in einen 500 ml-Sakaguchikolben gegeben, und 1/8 der auf dem vorstehend genannten Agarmedium gewachsenen Zellen wurde abgeschabt und in das Medium eingepflegt. Nach dem vollständigen Ablauf der Kultivierung wurde die Konzentration jeder Aminosäure und der verbleibenden Glucose und Maltose bestimmt. Als Kontrollen wurden Transformanten eingesetzt, die durch Einführen jedes der Plasmide in E. coli W3100 (tyrA) erhalten wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1

Stamm (Wirt/Plasmid)	Lys (g/l)	Thr (g/l)	Phe (g/l)	Verbliebene Glucose (g/l)	Verbliebene Maltose (g/l)
W3110(tyrA)/pRS	0,00	0,00	0,91	0,0	5,8
W3110(tyrA)malk327/pRS	0,00	0,00	0,86	0,0	0,0
W3110(tyrA)/pCABD2	9,55	-	-	0,0	5,6
W3110(tyrA)malk327/pCABD2	10,80	-	-	0,0	0,0
W3110(tyrA)/pVIC40	-	8,48	-	0,0	4,1
W3110(tyrA)malk327/pVIC40	-	8,62	-	0,0	0,0
W3110(tyrA)/pMGAL1	-	-	4,57	0,0	5,7
W3110(tyrA) malk327/pMGAL1	-	-	4,69	1,2	0,0

[0072] -: Nicht bestimmt, pRS: Vektor (die anfängliche Konzentration von Glucose und Maltose war 36 g/l beziehungsweise 5,8 g/l, und die Kultivierungsdauer war 14 Stunden)

Lys: Lysin; Thr: Threonin; Phe: Phenylalanin

[0073] Wenn *E. coli* W3100 (tyrA) als Wirt eingesetzt wurde, wurde Maltose nicht assimiliert, Glucose wurde jedoch verbraucht.

[0074] Andererseits wurde, wenn *E. coli* W3100 (tyrA)malk327 als Wirt eingesetzt wurde, Maltose innerhalb einer ähnlichen Kultivierungsdauer assimiliert, sodass gefunden wurde, dass der Verbrauch von Maltose von der Glucoserepression nicht betroffen war.

[0075] Außerdem zeigten die Stämme von *E. coli* W3100 (tyrA)malk327, welche jeweils pVIC40, pCABD2 und pMGAL1 enthielten, im Vergleich zu den Stämmen von *E. coli* W3100(tyrA), welche die jeweiligen Plasmide enthielten, verbesserte Fähigkeit zur Produktion von L-Lysin, L-Threonin und L-Phenylalanin.

SEQUENZLISTE

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> Verfahren zur Herstellung einer L-Aminosäure mittels Fermentator

<130> EPA-53894

<140>

<141> 2002-04-11

<150> JP 2001-135517

<151> 2001-05-02

<160> 8

<170>

PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 34

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 1

ggcggtaatg tggagatgcg cacataaaat cgcc

34

<210> 2

<211> 39

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 2

cctgagtcac tgctttttctt ttttcacatc acctgtgac

39

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 3

cggaagtgcg acaactgacg catttgctgg atcgc

35

<210> 4

<211> 35

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

```

<400> 4
gcgatccagc aaatgcgtca gttgtagcac ttccg
35

<210> 5
<211> 34
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 5
gatttcttta gtatcggcac caatgattta acgc
34

<210> 6
<211> 30
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 6
aaattgccgc gatctagaca gtgccattgc
30

<210> 7
<211> 40
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 7
gaaaccaacc acacattctc tatcgaatct gatagcggcg
40

<210> 8
<211> 40
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 8
cgccgctatc agattcgata gagaatgtgt gggttggttc
40

```

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer L-Aminosäure unter Verwendung eines Mikroorganismus, welches das Kultivieren des Mikroorganismus in einem Medium unter Produktion und Anhäufung der L-Aminosäure in dem Medium und das Gewinnen der L-Aminosäure aus dem Medium umfasst, wobei der Mikroorganismus ein mutanter oder rekombinanter Stamm eines Mikroorganismus ist, worin die Maltoseassimilation durch die Wechselwirkung zwischen dem IIA^{Glc}-Protein von Glucose-PTS und dem MalK-Protein kontrolliert wird, die Wechselwirkung zwischen dem IIA^{Glc}-Protein und dem MalK-Protein des mutanten oder rekombinanten Stammes verringert oder ausgeschaltet ist, der Stamm Glucose und Maltose aufnehmen kann und das Medium Glucose und Oligosaccharide als Kohlenstoffquellen enthält.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Oligosaccharid Maltose ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Wechselwirkung zwischen dem IIA^{Glc}-Protein von Glucose-PTS und MalK verringert oder ausgeschaltet ist, weil das in dem Mikroorganismus enthaltene MalK-Protein eine Mutation hat, die unter einer Mutation zum Substituieren eines Thr-Rests gegen den Ala-Rest an Position 124 und einer Mutation zum Substituieren eines Gln-Rests gegen den Leu-Rest an Position 327 ausgewählt ist.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Wechselwirkung zwischen dem IIA^{Glc}-Protein von Glucose-PTS und MalK verringert oder ausgeschaltet ist, weil das in dem Mikroorganismus enthaltene IIAGlc-Protein eine Mutation hat, die unter einer Mutation zum Substituieren eines Ser-Rests gegen den Gly-Rest an Position 47 und einer Mutation zum Substituieren eines Thr-Rests gegen den Ala-Rest an Position 76 ausgewählt ist.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die L-Aminosäure aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus L-Lysin, L-Threonin und L-Phenylalanin besteht.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der Mikroorganismus ein Escherichia-Bakterium ist.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

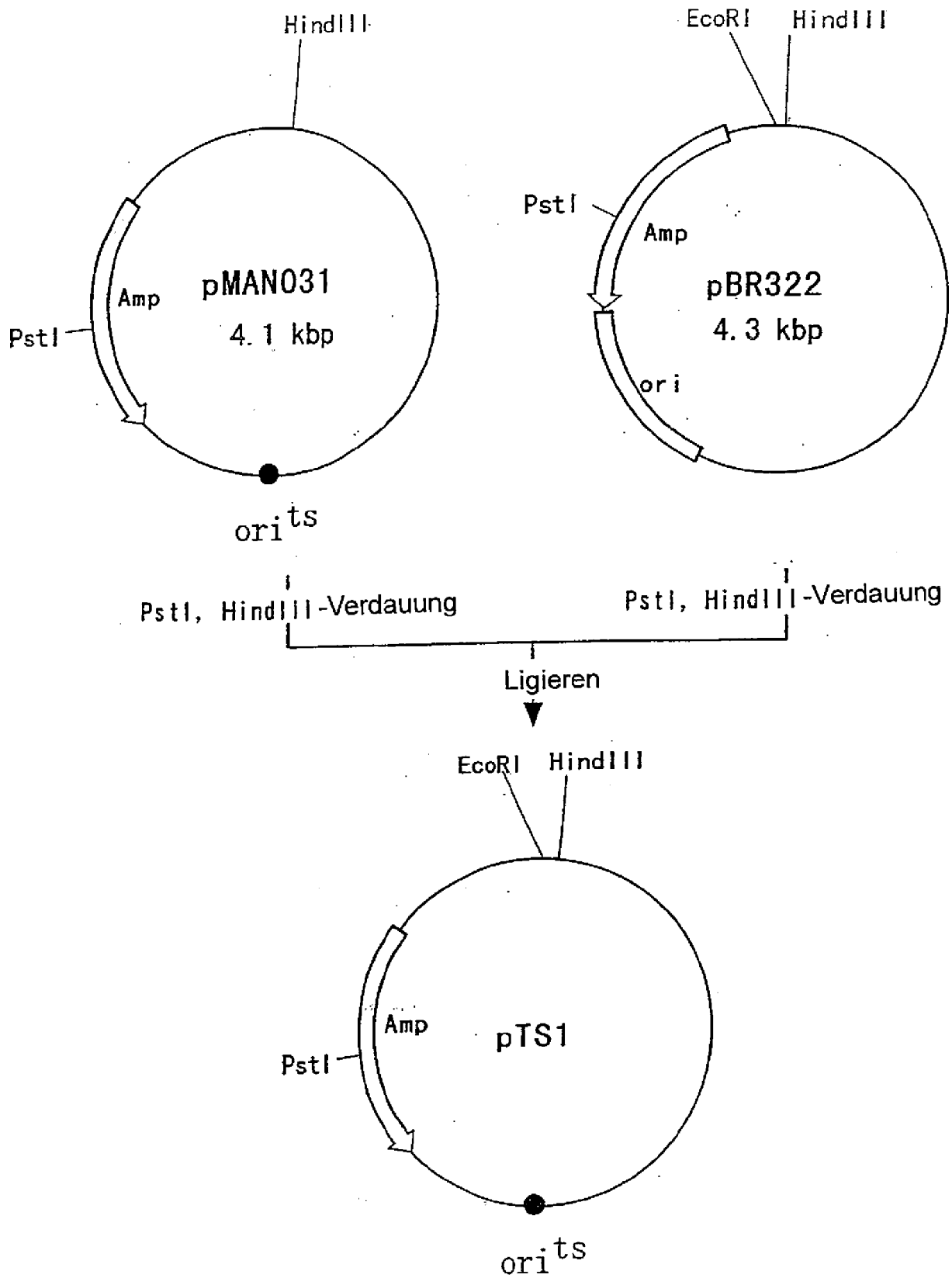


Fig. 1

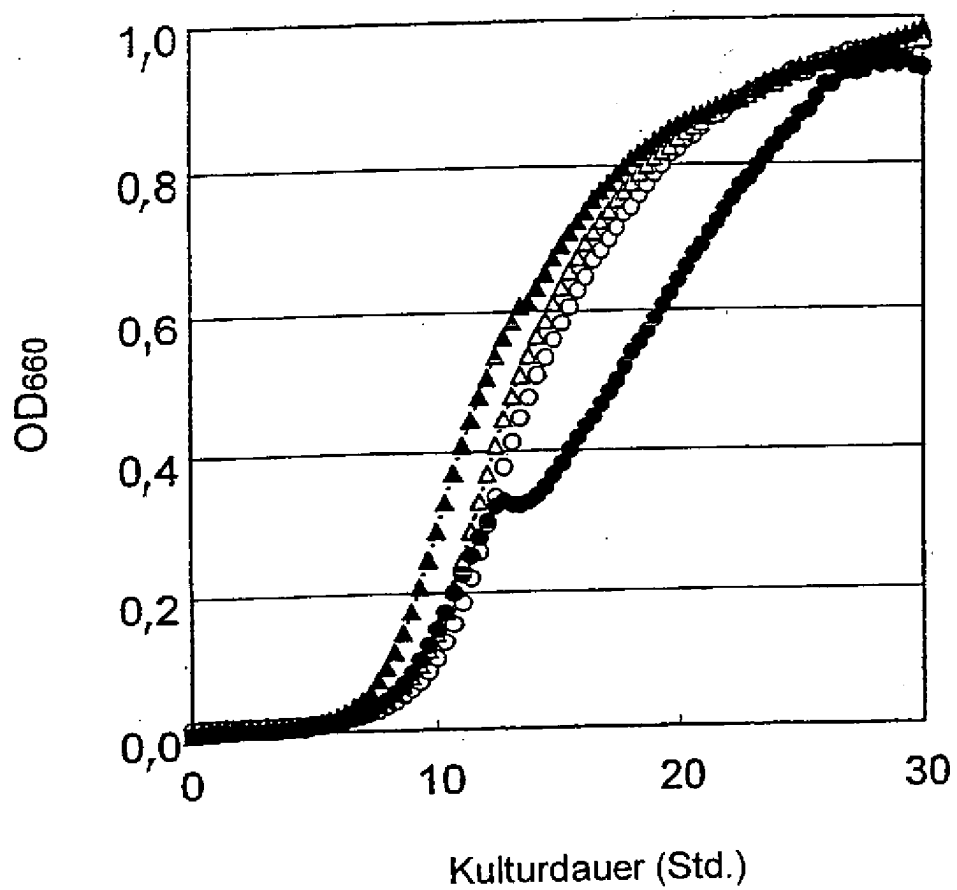


Fig. 2

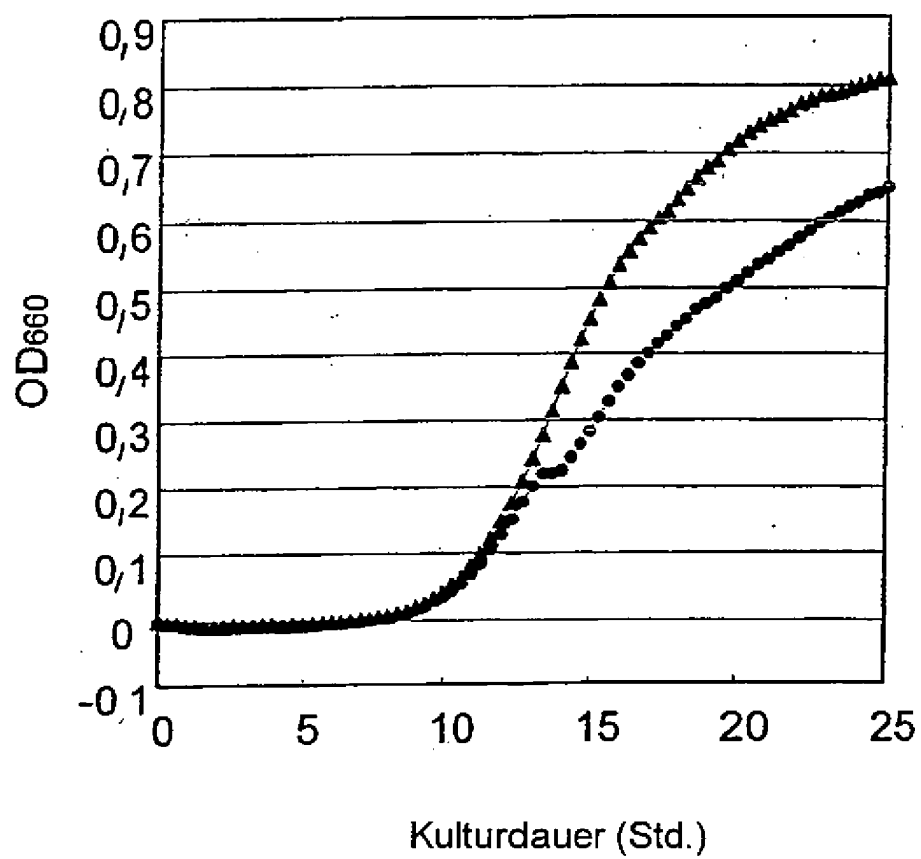


Fig. 3

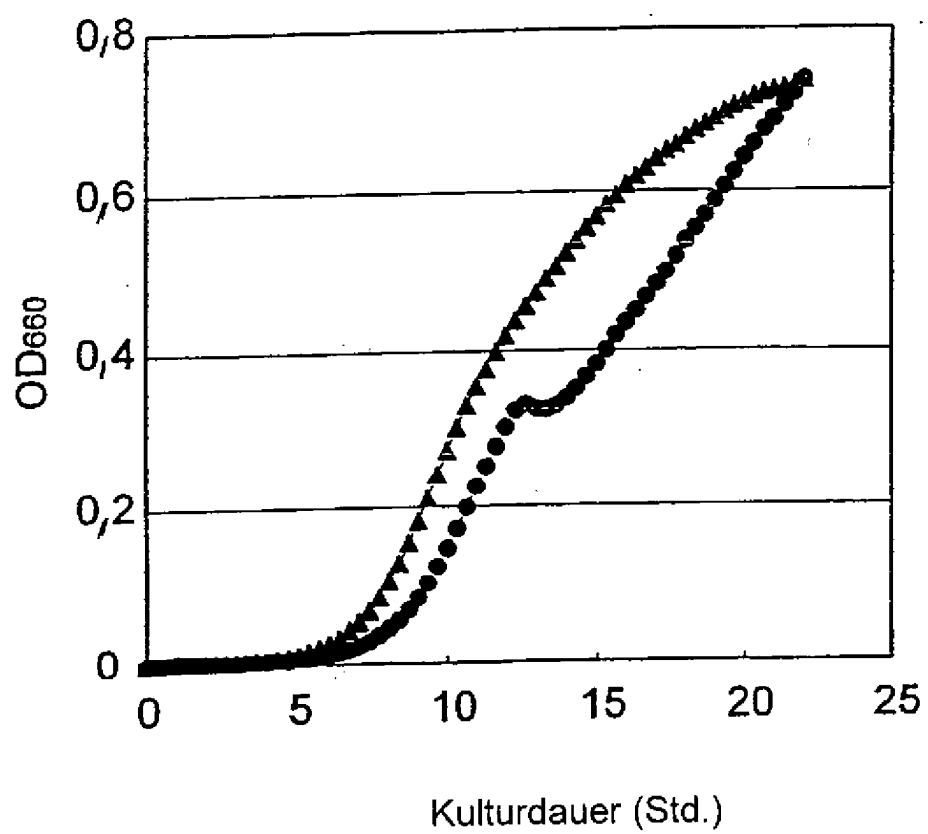


Fig. 4