

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
26. August 2010 (26.08.2010)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2010/094587 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation:
C07K 14/32 (2006.01) *C12P 7/00* (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2010/051464
- (22) Internationales Anmeldedatum:
8. Februar 2010 (08.02.2010)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
102009000989.2 18. Februar 2009 (18.02.2009) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **HENKEL AG & CO. KGAA** [DE/DE]; Henkelstr. 67, 40589 Düsseldorf (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **WEBER, Thomas** [DE/DE]; Herrenweg 7 b, 41541 Dormagen (DE). **BONGAERTS, Johannes** [DE/DE]; Arenzheide 5, 41541 Dormagen (DE). **EVERS, Stefan** [DE/DE]; Burscheidter Weg 5, 40822 Mettmann (DE). **MAURER, Karl-Heinz** [DE/DE]; Dechenstraße 5, 40699 Erkrath (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)

(54) Title: MICROBIAL SIDEROPHORE SYNTHESIS

(54) Bezeichnung : MIKROBIELLE SIDEROPHORSYNTHESE

(57) Abstract: The product yield for siderophores in a microbial fermentation is improved if the fermented microorganisms have a reduced expression of the fur gene, in particular if the fermentation does not occur under a lack of iron.

(57) Zusammenfassung: Die Produktausbeute für Siderophore in einer mikrobiellen Fermentation wird verbessert, wenn die fermentierten Mikroorganismen eine verminderte Expression des fur-Gens aufweisen, insbesondere wenn die Fermentation nicht unter Eisenmangel erfolgt.



WO 2010/094587 A1

Mikrobielle Siderophorsynthese

Die vorliegende Anmeldung betrifft Siderophor-bildende Mikroorganismen mit einem mutierten fur-Gen. Die vorliegende Anmeldung betrifft ferner Verfahren und Verwendungen zur Herstellung von Siderophoren mit solchen Mikroorganismen sowie mit *Bacillus licheniformis*.

Die Erfindung liegt auf dem Gebiet der Biotechnologie, insbesondere der Herstellung von Siderophoren durch Fermentation von Mikroorganismen. Siderophore (Eisenträger) sind kleine Moleküle mit komplexbildenden Eigenschaften, die zu den Catecholaten, Hydroxamaten oder zu den α -Hydroxy/ α -Ketocarbonsäuren gehören. Daneben existieren gemischt-funktionelle Siderophore, die auch Stickstoff-Liganden besitzen. Allen Siderophoren ist gemeinsam, dass sie einen mehrzähligen Liganden enthalten, der ein Metallion mit sechs, selten vier Zentren bindet. Sie werden beispielsweise von aeroben Bakterien, Pilzen und Pflanzenwurzeln gebildet und üblicherweise in das den jeweiligen Organismus umgebende Medium ausgeschieden. Siderophore weisen eine hohe Affinität zu Eisen(Fe)(III)-Ionen auf und binden daher sehr selektiv Eisen(III)-Ionen, die dann in die Zellen transportiert werden können. Trotz der großen Menge an in der Natur vorkommendem Eisen besitzt dieses eine sehr geringe Bioverfügbarkeit, die durch Siderophore oftmals ausgeglichen werden kann. Nach der Komplexierung der Eisen-Ionen werden die beladenen Siderophore von den Zellen der Siderophor-Produzenten über spezifische Transportsysteme wieder aufgenommen. Siderophore weisen üblicherweise eine molare Masse von 300 bis 2.000 Dalton auf. Die geringe Größe der Moleküle erlaubt es ihnen, die Zellwand von Bakterien, Pilzen oder Pflanzen zweimal durch relativ enge Kanäle zu durchqueren. Da die Komplexbindingkonstante der Siderophore für Fe(II)-Ionen sehr viel geringer ist als für dreiwertiges Eisen, wird das Eisenion in der Zelle nach Reduktion zu Eisen(II) aus dem Komplex gelöst. Alternative Freisetzungsmechanismen beruhen auf der hydrolytischen Spaltung des Siderophors und dadurch Aufhebung des Chelateffektes. Beispiele für Siderophore sind die Enterobactine, die von Enterobakterien hergestellt werden, die Ferrioxamine der Streptomyceten, die Ferrichrome der Pilze und die citrathaltigen Siderophore bei Pilzen und Bakterien.

Siderophore sind für verschiedene technische Anwendungen von Wert, zum Beispiel zur Entfernung von Metall-, insbesondere Eisenionen, die durch sie gebunden werden können, beispielsweise im Körper von Patienten, die unter freiem Eisen im Blut leiden, zur Rostentfernung oder zur Entfernung von Aluminium von hochreinen Siliziumoberflächen zur Halbleiterherstellung, zur probiotischen Beeinflussung von mikrobiellen Konsortien in Kosmetika, zur Unterdrückung mikrobiellen Wachstums eisenabhängiger Organismen, die das Siderophor-gebundene Eisen nicht verwerten können oder zur Herstellung von Siderophor-gekoppelten Antibiotika, die von den Siderophorproduzenten aufgenommen werden und dann in der Zelle ihre antibiotische Wirkung entfalten. Demzufolge sind Siderophore wertvolle Wirkstoffe, deren vielseitige Anwendbarkeit auch eine Vielfalt unterschiedlicher Siderophore in technisch relevanten Mengen erforderlich macht. Zu den besonders wertvollen Siderophoren zählt Schizokinen, u.a., da es zu

den Siderophoren zählt, deren Metallkomplexe als Bleichkatalysator in Wasch- und Reinigungsmitteln eingesetzt werden können.

Es ist bekannt, dass Siderophore und insbesondere Schizokinen mit Mikroorganismen hergestellt werden können. Beispiele für solche Mikroorganismen sind *Bacillus megaterium* ATCC 19213, *Rhizobium leguminosarum* IARI 917, *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* ATCC 11696 oder *Anabaena* sp. ATCC 27898. Allerdings ist die Siderophorproduktion bei Mikroorganismen abhängig von der Verfügbarkeit von Eisen für den Mikroorganismus. Ist ausreichend Eisen vorhanden, regulieren die Mikroorganismen die Siderophorproduktion herunter. Da die Siderophorproduktion von nicht gentechnisch oder in klassischen Zuchtverfahren optimierten Mikroorganismen somit nur unter sorgfältig eingestellten Eisenmangelbedingungen mit hinreichenden Ausbeuten gelingt, ist das Einstellen solcher Bedingungen schwierig, da die Eisenversorgung der Mikroorganismen insgesamt wachstumslimitierend für die Mikroorganismen ist. Weiterhin ist beim Einsatz komplexer Mediumsbestandteile, z.B. von Proteinhydrolysaten, eine genaue Einstellung des Eisengehaltes besonders schwierig, beispielsweise wegen Chargenschwankungen. Daher ist es besonders wünschenswert, einen Produktionsstamm verwenden zu können, der durch eine gewöhnlich hohe Eisenkonzentration im Medium, insbesondere komplexen Medium, nicht die Siderophorproduktion herunterreguliert.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, dass die Produktausbeute für Siderophore in einer Fermentation verbessert wird, wenn die fermentierten Mikroorganismen eine verminderte Expression des *fur*-Gens bzw. einer Entsprechung desselben aufweisen, insbesondere wenn die Fermentation nicht unter Eisenmangel erfolgt. Vorteilhafterweise wird durch eine möglichst weitgehende Inaktivierung des *fur*-Gens erreicht, dass der jeweilige Mikroorganismus vermehrt Siderophore synthetisiert, auch in Anwesenheit von ausreichend Eisen.

Gegenstand der Erfindung ist somit ein Siderophor-bildender Mikroorganismus, der dadurch gekennzeichnet ist, dass der Mikroorganismus durch mindestens eine Mutation im *fur*-Gen eine verminderte Expression dieses Gens aufweist im Vergleich zu einem zweiten Mikroorganismus, der diese Mutation nicht aufweist.

Ein Siderophor-bildender Mikroorganismus ist ein Mikroorganismus, der befähigt ist, mindestens ein Siderophor zu synthetisieren, vorzugsweise unter Eisenmangel. Ein Eisenmangel liegt beispielsweise dann vor, wenn weniger als 10 μM und zunehmend bevorzugt weniger als 5 μM , 4 μM , 3 μM , 2 μM , 1 μM , 0,5 μM und 0,1 μM Eisen-Ionen in der Umgebung des Mikroorganismus, insbesondere in dem Kultumedium oder in dem Substrat, auf dem der Mikroorganismus wächst, vorhanden sind.

Ein Siderophor im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist ein Molekül mit komplexbildenden Eigenschaften, welches mindestens einen mehrzähligen (polydentalen oder auch multidentalen) Liganden enthält, der eine hohe Affinität zu Eisen(Fe)(III)-Ionen aufweist und ein Eisen(Fe)(III)-Ion

bevorzugt mit sechs, selten vier Zentren bindet, insbesondere eines, das zugehörig ist zu den Catecholaten, Hydroxamaten oder zu den α -Hydroxy/ α -Ketocarbonsäuren oder welches einen Stickstoff-Liganden besitzt. Bevorzugte Siderophore weisen ferner Eigenschaften auf wie einleitend beschrieben.

Für die Siderophor-Synthese durch viele Mikroorganismen ist neben Genen, die für Enzyme des Siderophor-Biosyntheseweges codieren, das fur-Gen (bzw. eine jeweilige Entsprechung desselben) von Bedeutung, da das von ihm codierte Genprodukt, das Fur-Protein („ferric uptake regulator“), die Siderophor-Biosynthese reguliert. Die Produktion der Siderophore wird üblicherweise an die Eisenkonzentration innerhalb der Zelle gekoppelt. Das Protein Fur bindet Zink(II)- und Eisen(II)-Ionen (zweiwertiges Eisen). In Anwesenheit von ausreichend Eisen(II)-Ionen in der Zelle bindet Fur mit gebundenem zweiwertigen Eisen an bestimmte Gensequenzen, so genannte Fur-Boxen, wodurch die Transkription (als Voraussetzung der Genexpression) von Genen, die für die Biosynthese des Siderophors notwendig sind, blockiert und damit vermindert oder unterdrückt wird. Fur ist somit ein transkriptioneller Repressor (Fur-Repressor). Ist in der Zelle nicht mehr genügend zweiwertiges Eisen vorhanden, so verliert das Fur-Protein sein gebundenes zweiwertiges Eisen, wodurch Fur nicht mehr an die jeweilige Fur-Box bindet, so dass die Transkription bzw. Expression der für die Siderophor-Synthese notwendigen Gene ermöglicht wird. In der Folge wird die Siderophor-Produktion angeregt und die Zell-Transportkanäle für Eisen werden geöffnet. Ein Eisenmangel bewirkt somit eine verstärkte Siderophor-Produktion. Das fur-Regulon ist demnach die Gesamtheit aller Gene bzw. Operons, die von Fur-reguliert, insbesondere reprimiert, werden. Insbesondere umfasst das fur-Regulon Gene bzw. Operons, die eine Fur-Box umfassen. Als Beispiel für eine Fur-Box ist die Consensus-Sequenz der Fur-Box von *Bacillus subtilis* in SEQ ID NO. 4 angegeben. Ein Operon (Gencluster) ist eine Funktionseinheit der DNA von Prokaryoten, bestehend aus Promotor, Operator(en) und mehreren (Struktur-) Genen, die für Proteine mit typischerweise verwandten Funktionen codieren. Die Gene für die Biosynthese eines Siderophors sind bei vielen Mikroorganismen, insbesondere Bakterien, in einem oder mehreren Operons zusammengefasst. Je nach Operon können verschiedene regulatorische Proteine (Repressoren bzw. Aktivatoren), abhängig von ihrer Wechselwirkung mit von der Zelle aufgenommenen oder in der Zelle gebildeten Stoffen (Liganden oder Effektormolekülen), mit den Operatoren in Wechselwirkung treten und dadurch die Transkription der Gene im Operon an- oder abschalten. Auf diese Weise wird die Synthese der betreffenden mRNA (messenger-RNA) und damit indirekt der codierten Genprodukte, also Proteine, aktiviert oder gehemmt. Alle Gene eines Operons werden daher koordiniert gesteuert. Bezogen auf das Fur-Protein ist eine Fur-Box daher ein Operator beispielsweise in einem Siderophor-Biosynthese-Operon, der durch das Fur-Protein gesteuert wird.

Eine Mutation ist eine Veränderung in einer Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenz. Eine solche Veränderung kann beispielsweise durch bekannte molekularbiologische Methoden herbeigeführt werden, betreffend Nukleinsäuren kann sie jedoch auch im lebenden Organismus durch Umwelteinflüsse oder während Nukleinsäure-Syntheseprozessen entstehen. Eine im Vergleich mit einer Ausgangssequenz veränderte Sequenz kann daher als mutierte Sequenz betrachtet werden. Je nach Art der Änderung sind

beispielsweise Deletions-, Insertions- oder Substitutionsmutationen (bei Nukleinsäuren oftmals auch als Punktmutationen bezeichnet) bekannt oder solche, bei denen verschiedene Gene oder Teile von Genen miteinander fusioniert werden. Jeweils bezogen auf eine Ausgangssequenz ist eine Substitution eine Veränderung an einer Nukleotid- oder Aminosäureposition, d.h. ein Nukleotid- oder Aminosäureaustausch, bei einer Insertion ist an bzw. nach der jeweiligen Sequenzposition ein oder mehrere zusätzliche(s) Nukleotid(e) bzw. Aminosäure(n) vorhanden, und bei einer Deletion fehlt mindestens ein oder mehrere Nukleotid(e) bzw. Aminosäure(n). Die zugehörigen Organismen werden als Mutanten bezeichnet. Betreffend Nukleinsäuren werden die Begriffe Nukleotid und Basenpaar in der vorliegenden Anmeldung synonym verwendet: Der Begriff Nukleotid bezeichnet einen Nukleinsäure-Baustein, also eine der Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin bzw. Uracil mit ihrem Zuckerphosphatrest und bezieht sich somit eher auf eine einzelsträngige Nukleinsäure. Da DNA-Moleküle doppelsträngig sind, ist eine Deletion eines Nukleotids in einem DNA-Strang daher gleichzusetzen mit der Deletion des ganzen Basenpaares, da dann auch auf dem hybridisierenden Strang das korrespondierende Nukleotid entfernt wird. Daher ist mit der Formulierung „Nukleotid“ betreffend RNA-Molekülen das einzelne Nukleotid gemeint, betreffend DNA-Moleküle das Basenpaar, sofern an der jeweiligen Stelle nichts anderes angegeben ist. Unter Fragmenten werden alle Nukleinsäuren bzw. Proteine oder Peptide verstanden, die kürzer sind als ihre vollständigen Entsprechungen, insbesondere beispielsweise die jeweilige Wildtyp-Nukleinsäure oder das jeweilige Wildtyp-Protein. Unter Wildtyp ist zu verstehen, dass die Nukleinsäure oder das Protein in einem natürlich vorkommenden Organismus bzw. in einem Organismus aus einem natürlichen Habitat vorhanden ist und aus diesem isoliert werden kann. Fragmente sind daher Teilsequenzen einer jeweiligen Ausgangssequenz. Aufgrund ihrer Sequenz können sie den jeweiligen vollständigen Nukleinsäuren bzw. Proteinen zugeordnet werden, beispielsweise in einem Alignment. Sie können beispielsweise gleiche Strukturen annehmen oder enzymatische Aktivitäten oder Teilaktivitäten ausüben, wie beispielsweise die Komplexbildung eines bestimmten Substrats. Deletionsmutierte Nukleinsäuren und Nukleinsäure-Fragmente sind prinzipiell gleichartig dadurch, dass ein oder mehrere Nukleotide im Vergleich zu einer Ausgangssequenz fehlen; während Fragmente üblicherweise kleine Stücke einer Ausgangssequenz umfassen, fehlen deletionsmutierten Nukleinsäuren üblicherweise nur kurze Bereiche. Als Folge der Deletion kann nach der Translation der aus der DNA entstandenen mRNA ein Protein entstehen, das seine ursprüngliche Funktion nicht mehr ausüben kann. Durch die Deletion von Nukleotiden kann eine Leserasterverschiebung hervorgerufen sein, wenn eine Anzahl von Nukleotiden entfernt wurde, die nicht durch drei teilbar ist. Die Deletion von einem oder mehreren ganzen Codons/Basentriplets führt meistens ebenfalls zu einem fehlerhaften Protein, da dann mindestens eine Aminosäure fehlt – jedoch wird das Leseraster nicht verschoben. Im letzteren Fall ist es möglich, dass das entstandene Protein noch teilfunktionsfähig ist und einen schwächeren Phänotyp hervorruft als eine Nullmutante. Insertionen sind wie Deletionen nicht auf einzelne Nukleotide oder Aminosäuren beschränkt. Vielmehr können auch mehrere Nukleotide bzw. Aminosäuren oder ganze Fragmente oder selbst ganze Nukleinsäuren oder Proteine in eine entsprechende Ausgangssequenz eingefügt sein oder mit einer Ausgangssequenz fusioniert sein. Hierzu gehören auch Neukombinationen von größeren Nukleinsäure- oder Proteinabschnitten, also Fragmenten, mit anderen Nukleinsäuren oder Proteinen.

Unter der Expression eines Gens wird dessen Übersetzung in das bzw. die von diesem Gen codierte(n) Genprodukt(e) verstanden, also in ein Protein bzw. in mehrere Proteine. In der Regel umfasst die Genexpression die Transkription, also die Synthese einer Ribonukleinsäure (mRNA) anhand der DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Sequenz des Gens und deren Translation in die entsprechende Polypeptidkette. Die Expression eines Gens führt zur Bildung des entsprechenden Genproduktes, das seine jeweilige Funktion ausübt. Diese Funktion kann eine physiologische Aktivität sein und/oder eine solche bewirken und/oder ein Beitrag zu einer übergeordneten physiologischen Aktivität sein, an der mehrere verschiedene Genprodukte beteiligt sind. Eine bevorzugte physiologische Aktivität im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist die enzymatische Katalyse einer Reaktion der Siderophor-Biosynthese, die übergeordnete physiologische Aktivität ist entsprechend die Siderophor-Biosynthese insgesamt. Die Expression eines Gens ist erhöht, sofern mehr Genprodukt gebildet wird und/oder die durch das Genprodukt bewirkte physiologische Aktivität und/oder übergeordnete physiologischen Aktivität, an der mehrere verschiedene Genprodukte beteiligt sind, verstärkt wird oder verstärkt auftritt. Die Expression eines Gens ist vermindert, sofern weniger Genprodukt gebildet wird und/oder die durch das Genprodukt bewirkte physiologische Aktivität und/oder übergeordnete physiologischen Aktivität, an der mehrere verschiedene Genprodukte beteiligt sind, vermindert wird oder vermindert auftritt. Die Messung der Genexpression erfolgt durch fachübliche Routinemethoden der Molekularbiologie. Sie kann beispielsweise erfolgen durch die Messung der RNA Konzentration in den Zellen durch Northern Blotting, SAGE, RT-PCR, Microarray-Techniken, usw. Alternativ kann sie auch erfolgen durch Messung der Konzentration des Genproduktes, also des von dem jeweiligen Gen codierten Proteins, in den Zellen oder durch Messung der durch das Genprodukt bewirkten physiologischen Aktivität und/oder übergeordneten physiologischen Aktivität. Im Falle des *fur*-Gens ist eine solche Aktivität beispielsweise die Siderophorsynthese. Daher kann die Expression eines solchen Gens auch ermittelt werden durch Bestimmung der Siderophorsynthese, wobei sich eine verminderte Genexpression bevorzugtermaßen in einer verstärkten Siderophorsynthese in Anwesenheit von ausreichend Eisen(III)-Ionen im Kulturmedium manifestiert.

Eine verminderte Expression des *fur*-Gens wird im Sinne der vorliegenden Anmeldung durch jede Art von Modifikation oder Mutation des Gens erreicht, wonach die Menge und/oder Funktion des von dem Gen codierten Genproduktes, im Falle des *fur*-Gens also des Fur-Proteins, im Hinblick auf dessen Fähigkeit, die Siderophor-Synthese zu verringern oder gänzlich zu unterdrücken, vermindert oder vorteilhafterweise möglichst vollständig unterbunden wird. Dazu gehören die Ausgestaltungen, dass ein praktisch vollständiges, aber inaktives Protein gebildet wird, dass inaktive Teile eines solchen Proteins in der Zelle vorliegen, dass das zugehörige Gen nicht mehr translatiert oder transkribiert wird oder sogar vollständig oder teilweise deletiert ist. Alternativ können auch Substitutionsmutationen oder Insertionen vorliegen, die Vorstehendes bewirken. Durch solche Veränderungen auf genetischer Ebene wird erreicht, dass das jeweilige Gen ausgeschaltet oder zumindest hinsichtlich seiner Expression negativ beeinflusst wird. Somit

kommt das entsprechende Genprodukt, also das Fur-Protein, in dem erfindungsgemäßen Mikroorganismus nicht mehr auf seine natürliche Weise zur Wirkung.

Die verminderte Expression des mutierten fur-Gens wird gegenüber einem zweiten Mikroorganismus bestimmt, der diese Mutation nicht aufweist. Der erfindungsgemäße Mikroorganismus und der zweite Mikroorganismus können grundsätzlich zwei beliebige Mikroorganismen sein. Der erfindungsgemäße Mikroorganismus ist auf Grund seiner Mutation im fur-Gen befähigt, in einer Kultur und/oder Fermentation im Vergleich zu dem zweiten Mikroorganismus in Anwesenheit von ausreichend Eisen(III)-Ionen, bevorzugt in Anwesenheit von mindestens 10µM Eisen(III)-Ionen, vermehrt Siderophore zu bilden, da die Siderophor-Synthese in diesem Mikroorganismus durch ein Genprodukt des fur-Gens nicht unterdrückt wird. Die vermehrte Siderophor-Bildung ist dabei bezogen auf die Einzelzelle oder die gleiche Zellzahl. Als Maß für die Zellzahl kann neben der absoluten Zellzahl selbst auch die optische Dichte der Kultur bei 600nm Wellenlänge (OD600) verwendet werden. Die Siderophorproduktion wird durch einen CAS-Flüssig- und/oder Eisenperchlorat-Test gemessen, wie er weiter unten beschrieben ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist ein erfindungsgemäßer Mikroorganismus dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroorganismus ein nicht natürlicher Mikroorganismus ist. Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist dadurch gekennzeichnet, dass der zweite Mikroorganismus ein natürlicher Mikroorganismus ist. Nicht natürlich bedeutet in diesem Zusammenhang, dass der Mikroorganismus in dieser Form nicht in der Natur vorkommt, der Mikroorganismus also kein Wildtyp ist. Dies betrifft insbesondere die Nukleinsäuresequenz des fur-Gens. Das bedeutet, dass die Nukleinsäuresequenz keine ursprüngliche Sequenz des Mikroorganismus ist, d.h. in der Wildtyp-Form des Mikroorganismus nicht in dieser Form vorhanden ist bzw. aus diesem isoliert werden kann. Eine natürliche Nukleinsäuresequenz wäre daher im Genom des betrachteten Mikroorganismus per se, also in dessen Wildtyp-Form, vorhanden. In erfindungsgemäße Mikroorganismen dagegen wurde eine solche Sequenz eingebracht bzw. in diesen erzeugt, beispielsweise mit Hilfe gentechnologischer Verfahren. Ein solcher Mikroorganismus weist daher vorzugsweise eine genetisch modifizierte Nukleinsäuresequenz, insbesondere ein genetisch modifiziertes fur-Gen, auf. Diese Sequenz war somit nicht natürlicherweise in dem jeweiligen Mikroorganismus vorhanden, so dass der Mikroorganismus um diese modifizierte Sequenz bereichert wurde. Diese Ausführungsformen betreffen daher den Sachverhalt, dass ein erfindungsgemäßer Mikroorganismus bevorzugt durch gentechnologische Verfahren aus einem Vorläufer- Mikroorganismus erzeugt wird, wobei der Vorläufer-Mikroorganismus ein Wildtyp sein kann oder ein Mikroorganismus, der bereits genetische Veränderungen im Vergleich zu seiner Ursprungsform (Wildtyp) aufweist.

Hierfür kann eine für ein nichtaktives Fur-Protein codierende Nukleinsäure eingesetzt werden, beispielsweise eine, die eine oder mehrere Substitutionen oder eine oder mehrere Deletionen oder eine oder mehrere Insertionen oder Kombinationen hiervon aufweist. Ferner kann eine Nukleinsäure eingesetzt werden, die in einem Bereich verändert ist, der nicht für das Protein selbst codiert, aber

beispielsweise für dessen Expression eine regulatorische Funktion innehat (genregulatorische Sequenz), beispielsweise einer Promotor-Sequenz, einer Enhancer-Sequenz, einem Operator oder allgemein einer Sequenz mit einer Steuerungsfunktion der Expression dieses Gens. Denn um die Expression eines Gens zu beeinflussen, insbesondere zu vermindern bzw. zu inaktivieren, ist es nicht zwingend notwendig, den proteincodierenden Bereich zu manipulieren. Vielmehr lässt sich eine Beeinflussung der Genaktivität auch durch Manipulation genregulatorischer Sequenzen erreichen. Häufig befinden sich solche Sequenzen in benachbarten Sequenzabschnitten zu dem für ein Protein codierenden Nukleinsäureabschnitt, den sogenannten flankierenden Bereichen. Die flankierenden Bereiche können dabei ausgehend von den bekannten Sequenzen über an sich bekannte Methoden, beispielsweise mithilfe nach außen gerichteter PCR-Primer und einer Präparation genomischer DNA als Matrize ermittelt werden (anchored PCR). Alternativ zu diesem experimentellen Ansatz können derartige Bereiche für viele Mikroorganismen bzw. mit diesen verwandten Spezies aus Datenbankeinträgen entnommen werden, beispielsweise der Datenbank SubtiList des Institut Pasteur, Paris, Frankreich (<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/index.html>), insbesondere für Bakterien der Gattung *Bacillus*, beispielsweise *Bacillus subtilis* oder *Bacillus licheniformis*.

Derartige Nukleinsäuren können über an sich bekannte Verfahren zur Veränderung von Nukleinsäuren erzeugt werden. Solche sind beispielsweise in einschlägigen Handbüchern wie dem von Fritsch, Sambrook und Maniatis, „Molecular cloning: a laboratory manual“, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989, dargestellt. Zudem stehen hierfür inzwischen zahlreiche kommerzielle Systeme, sogenannte Kits, zur Verfügung, etwa das QuickChange®-Kit der Firma Stratagene, La Jolla, USA. Dessen Prinzip besteht darin, daß Oligonukleotide mit einzelnen Austausch (Mismatch-Primer) synthetisiert und mit dem einzelsträngig vorgelegten Gen hybridisiert werden; anschließende DNA-Polymerisation ergibt dann eine entsprechende Nukleinsäure, die die gewünschte Mutation aufweist. Oftmals wird für die Verminderung der Expression eines Gens eine Nukleinsäure mit einer oder mehreren Deletions- oder Insertionsmutationen oder Kombinationen hiervon eingesetzt. Beispielsweise können Deletionen die 70 bis 150 Nukleinsäurepositionen umfassenden Randsequenzen des für das Protein codierenden Bereichs betreffen.

Somit ist es möglich, die Expression des *fur*-Gens durch einen Mikroorganismus, insbesondere einem in einer Fermentation als Wirtszelle eingesetzten Mikroorganismus, dadurch zu verhindern bzw. zu vermindern, dass eine aktivitätsveränderte, vorteilhafterweise inaktive Kopie des betreffenden Gens oder eines Teiles hiervon in den Mikroorganismus transformiert wird, wo über eine – bis dahin noch mögliche – homologe Rekombination das aktive Gen bzw. der entsprechende Teil des aktiven Gens gegen die aktivitätsveränderte, vorteilhafterweise inaktive Kopie ausgetauscht wird. Auch solche Verfahren sind dem Fachmann an sich vertraut. Zuvor wird die aktivitätsveränderte, vorteilhafterweise inaktive Kopie des Gens hierfür üblicherweise in einen entsprechenden Transformationsvektor eingebracht. Im Falle von Insertionsmutationen kann lediglich das intakte Gen unterbrochen werden oder es kann anstelle eines Genteils ein anderes Gen, beispielsweise ein Selektionsmarker eingefügt werden. Hierüber ist das

Mutationsereignis in bekannter Weise phänotypisch überprüfbar. Analog kann selbstverständlich auch ein genregulatorischer Abschnitt durch einen entsprechend modifizierten Abschnitt ersetzt werden, so dass die genregulatorische Wirkung dieser Sequenz verändert ist, insbesondere die expressionsstimulierende Wirkung einer solchen regulatorischen Sequenz vermindert bzw. nicht mehr vorhanden ist. Genauso kann eine Insertion einer Sequenz, beispielweise eines Selektionsmarkers, in eine solche genregulatorische Sequenz erfolgen. Um die jeweils notwendigen Rekombinationsereignisse zwischen dem in die Zelle eingeführten inaktiven Gen und dem endogen vorhandenen intakten Gen zu ermöglichen, ist es nach dem derzeitigen Wissensstand vorteilhaft, dass die jeweiligen Randsequenzen (flankierende Regionen) des eingeführten Genabschnitts und des endogenen Genabschnitts in einer ausreichenden Anzahl von zusammenhängenden Nukleinsäure-positionen, vorteilhafterweise in mindestens 70 bis 150 Nukleinsäurepositionen, übereinstimmen. Ein solches Maß an Übereinstimmung unterstützt das Eintreten der homologen Rekombinationsereignisse, die einen Austausch der Genabschnitte (intakter Abschnitt gegen inaktiven Abschnitt) bewirken.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist ein erfindungsgemäßer Mikroorganismus dadurch gekennzeichnet, dass er aus dem zweiten Mikroorganismus durch mindestens eine Deletion und/oder mindestens eine Insertion und/oder Substitution von mindestens einem Nukleotid im fur-Gen erhalten werden kann. In diesem bevorzugten Fall ist der zweite Mikroorganismus daher der Vorläufer- Mikroorganismus, wobei er ein Wildtyp sein kann oder ein Mikroorganismus, der bereits genetische Veränderungen im Vergleich zu seiner Ursprungsform (Wildtyp) aufweist. Der erfindungsgemäße Mikroorganismus wird dann aus diesem zweiten Mikroorganismus erhalten durch eine entsprechende genetische Veränderung des fur-Gens, also durch eine Deletion und/oder eine Insertion und/oder Substitution von mindestens einem Nukleotid bzw. Basenpaar. Gemäß dieser Ausgestaltung kann ein Mikroorganismus, der mindestens ein Siderophor unter Eisenmangel synthetisieren kann – also der Ausgangs- bzw. der zweite Mikroorganismus -, daher erfindungsgemäß so modifiziert werden, dass der Mikroorganismus das Siderophor auch in Abwesenheit eines Eisenmangels und somit in Anwesenheit von ausreichend Eisen, insbesondere Eisen(III)-Ionen, synthetisiert. Solche Mikroorganismen sind für die fermentative Siderophor-Produktion bevorzugt, da sie höhere Produktausbeuten in Anwesenheit von Eisen, insbesondere Eisen(III)-Ionen, ermöglichen, wie es beispielsweise in Vollmedien oder komplexen Medien vorhanden ist.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist somit dadurch gekennzeichnet, dass ein erfindungsgemäßer Mikroorganismus in Gegenwart von mindestens 0,1µM und zunehmend bevorzugt von mindestens 0,5µM, 1µM, 2µM, 3µM, 4µM, 5µM und 10µM Eisen(III)-Ionen eine gegenüber dem zweiten Mikroorganismus gesteigerte Siderophor-Synthese aufweist. Die gesteigerte Siderophor-Synthese ist dabei wiederum bezogen auf die Einzelzelle oder die gleiche Zellzahl. Als Maß für die Zellzahl kann neben der absoluten Zellzahl selbst auch die optische Dichte der Kultur bei 600nm Wellenlänge (OD600) verwendet werden. Bevorzugt erfolgt die Messung der Siderophorproduktion im Rahmen der vorliegenden Erfindung durch einen CAS-Flüssig-Test und/oder Eisenperchlorat-Test wie nachstehend beschrieben:

1. CAS-Flüssig-Test: Zur quantitativen Erfassung von Siderophoren in Lösungen und Kulturüberständen wird der CAS-Flüssig-Test nach Schwyn & Neillands (1987; Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores; Anal Biochem 160: 47-56) in geringfügig modifizierter Art durchgeführt.

Lösungen:

- a) 2mM CAS-Stammlösung: 121mg Chromazurol S („CAS“, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) wird in 100ml entionisiertem Wasser gelöst.
- b) HDTMA-Lösung: 21,9mg Hexadecyltrimethylammoniumbromid wird unter vorsichtigem Rühren in 50ml entionisiertem Wasser gelöst.
- c) Piperazin-Puffer: 4,307g Piperazin (wasserfrei) werden in 30ml entionisiertem Wasser gelöst und der pH-Wert auf 5,6 mit konzentrierter Salzsäure eingestellt.
- d) CAS-Testlösung: 1,5ml 1mmol/l Eisen(III)chlorid in 10mmol/l Salzsäure werden mit 7,5ml CAS-Stammlösung gemischt und langsam unter leichtem Rühren in die HDTMA-Lösung gegossen. Der Piperazin-Puffer wird unter leichtem Rühren hinzugegeben, dann wird mit entionisiertem Wasser auf 100ml Volumen aufgefüllt. Anschließend wird mit 50g/100ml Natriumhydroxidlösung auf pH 6,3 eingestellt und im Anschluss mit entionisiertem Wasser auf 125ml Volumen aufgefüllt.

Der Test selbst wird in 96er Mikrotiterplatten aus Polystyrol mit 100µl Probe pro Vertiefung durchgeführt. Je 100µl CAS-Testlösung werden zügig zu allen Proben gegeben und die Platte für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt die Messung der Extinktion E bei 630nm Wellenlänge in einem Mikrotiterplattenlesegerät. Als Referenz („Referenz 1“) dient eine Probe aus 100µl entionisiertem Wasser, die gleich behandelt wurde. Vorteilhafterweise werden Duplikate oder Triplikate jeder Probe gemessen und die entsprechenden Ergebnisse gemittelt. Da der lineare Bereich des Tests bis ca. 70% CAS-Einheiten (s.u.) reicht, werden Proben über 70% CAS-Einheiten entsprechend verdünnt und erneut gemessen. Der Siderophorgehalt wird nach folgender Formel aus den Extinktionen E ermittelt: CAS-Einheiten in % = $(E_{\text{Referenz 1}} - E_{\text{Probe}}) * 100$.

Aufgrund der Farbentwicklung im Kulturüberstand werden die jeweiligen Ergebnisse jedoch folgendermaßen korrigiert: Da die Referenz 1 (Wasser) die Färbung des Mediums nicht widerspiegelt, wird eine weitere Probe („Referenz 2“) nach obiger Prozedur gemessen, welche aus der zu messenden Probe (ggf. gleichsam verdünnt) versetzt mit 100µl entionisiertem Wasser anstelle CAS-Testlösung besteht. Die Extinktion für die korrigierte Referenz wird somit wie folgt bestimmt:

$E_{\text{Referenz}} = E_{\text{Referenz 1}} + E_{\text{Referenz 2}} - E_{\text{leere Vertiefung}}$ und anschließend in die obige Formel eingesetzt, womit sich ergibt: CAS-Einheiten in % = $(E_{\text{Referenz}} - E_{\text{Probe}}) * 100$.

2. Eisenperchlorat-Test: Die Quantifizierung von Hydroxamat-Siderophoren in Kulturüberständen kann ferner mit dem Eisenperchlorat-Test nach Varma (1998; Mycorrhiza Manual, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Deutschland) erfolgen.

Lösungen:

a) Perchlorsäure-Lösung: 15ml 60% Perchlorsäure werden mit entionisiertem Wasser auf 45ml aufgefüllt
b) Saure Eisen(III)-Lösung: 1,351g Eisen(III)chlorid-Hexahydrat werden in 45ml der Perchlorsäurelösung aufgelöst.

c) Testlösung: die saure Eisen(III)-Lösung wird mit entionisiertem Wasser auf 1l aufgefüllt.

Für die Messung werden 100µl Probe und 100µl Testlösung in einer Mikrotiterplatte gemischt und 10min ohne Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Extinktion E bei 480nm Wellenlänge gemessen. Die Hintergrundextinktion der Probe wird mit entionisiertem Wasser statt der Testlösung analog gemessen, sie spiegelt die bereits in der Probe bestehenden Eisen-Hydroxamatsiderophor-Komplexe wieder. Die Addition der beiden Extinktionen (mit Abzug der Eigenextinktion der leeren Vertiefung) spiegelt dann die Summe von eisenhaltigem und eisenfreien Hydroxamatsiderophoren in der Probe wieder: $E_{\text{gesamt}} = E_{\text{Probe mit Testlösung}} + E_{\text{Probe mit Wasser}} - E_{\text{leere Vertiefung}}$

Dies ist nur bei Verwendung farbloser (Mineral-)Medien möglich, die keine zusätzliche Eigenextinktion bei 480nm aufweisen. Die so ermittelte Gesamtextinktion dient als Maß für die Hydroxamatsiderophorkonzentration der Probe.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist ein erfindungsgemäßer Mikroorganismus dadurch gekennzeichnet, dass das fur-Gen eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die zu der in SEQ ID NO. 1 angegebenen Nukleinsäuresequenz mindestens zu 50% identisch ist. Bevorzugt umfasst das fur-Gen eine Nukleinsäuresequenz, die zu der in SEQ ID NO. 1 angegebenen Nukleinsäuresequenz zunehmend bevorzugt zu mindestens 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% und ganz besonders bevorzugt zu 100% identisch ist. Die zugehörige Aminosäuresequenz des Fur-Proteins ist in SEQ ID NO. 2 angegeben. Diese erfindungsgemäße Ausgestaltung bezieht sich auf die Nukleinsäuresequenz von *Bacillus licheniformis*. Wie die Beispiele der vorliegenden Anmeldung belegen, können Mikroorganismen der Art *Bacillus licheniformis* besonders vorteilhaft erfindungsgemäß verändert werden, um die Siderophorbildung auch in Gegenwart von ausreichend Eisen, insbesondere Eisen(III)-Ionen, zu verbessern. Gleiches gilt auch für Mikroorganismen, die eine zur fur-Sequenz gemäß SEQ ID NO. 1 von *Bacillus licheniformis* entsprechend ähnliche Nukleinsäuresequenz besitzen, also die zu der in SEQ ID NO. 1 angegebenen Nukleinsäuresequenz zu den angegebenen Prozentsätzen identisch ist. Solche Mikroorganismen besitzen daher eine Fur-Entsprechung, also ein zu fur homologes Gen.

Die Bestimmung der Identität von Nukleinsäure- (oder auch Aminosäure-)Sequenzen erfolgt durch einen Sequenzvergleich. Solch ein Vergleich geschieht dadurch, dass ähnliche Abfolgen in den Nukleotidsequenzen (oder auch Aminosäuresequenzen) einander zugeordnet werden. Eine tabellarische Zuordnung der betreffenden Positionen wird als Alignment bezeichnet. Bei der Analyse von Nukleotidsequenzen sind wiederum beide komplementären Stränge und jeweils allen drei möglichen Leserastern zu berücksichtigen, ebenso die Degeneriertheit des genetischen Codes und die organismenspezifische Verwendung der Codons (Codon-Usage). Üblicherweise werden Sequenzvergleiche und Alignments über Computerprogramme erstellt. Häufig genutzt werden

beispielsweise Clustal (vgl. beispielsweise Chenna et al. (2003): Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acid Research 31, 3497-3500) oder T-Coffee (vgl. beispielsweise Notredame et al. (2000): T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. J. Mol. Biol. 302, 205-217) sowie BLAST oder FASTA für die Datenbanksuche, beziehungsweise Programme, die auf diesen Programmen bzw. Algorithmen basieren. In der vorliegenden Patentanmeldung wurden Sequenzvergleiche und Alignments mit dem Computer-Programm Vector NTI® Suite 7.0 (Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, Kalifornien, USA) mit den vorgegebenen Default-Parametern erstellt.

Solch ein Vergleich erlaubt eine Aussage über die Ähnlichkeit der verglichenen Sequenzen zueinander. Sie wird üblicherweise in Prozent Identität, das heißt dem Anteil der identischen Nukleotide oder Aminosäurereste an denselben bzw. in einem Alignment einander entsprechenden Positionen angegeben. Ein weiter gefasster Begriff der Homologie bezieht bei Aminosäuresequenzen konservierte Aminosäure-Austausche in die Betrachtung mit ein, also Aminosäuren mit ähnlicher chemischer Aktivität, da diese innerhalb des Proteins meist ähnliche chemische Aktivitäten ausüben. Daher kann die Ähnlichkeit der verglichenen Sequenzen auch Prozent Homologie oder Prozent Ähnlichkeit angegeben sein. Identitäts- und/oder Homologieangaben können über ganze Polypeptide oder Gene oder nur über einzelne Bereiche getroffen werden.

Homologe Gene („Entsprechungen“) sind Gene, die für Genprodukte mit gleicher oder ähnlicher Funktion codieren, beispielsweise für Repressoren der Siderophor-Biosynthese (Fur-Homologe) oder für Enzyme, die vergleichbare Reaktionen im jeweiligen Siderophor-Syntheseweg katalysieren. Sie weisen oftmals ähnliche Nukleotidsequenzen oder Teilsequenzen auf, so dass ein Sequenzvergleich der homologen Gene in einem Alignment einen wie vorstehend angegebenen Mindest-Identitätswert ergibt. Homologe Gene in anderen Mikroorganismen können damit insbesondere auf Grund von Sequenzhomologien durch Sequenzvergleiche ermittelt werden und sind in die Erfindung eingeschlossen, insbesondere im Rahmen der jeweils angegebenen Mindest-Identitätswerte. Eine alternative oder zusätzliche Bestätigung der Zuordnung homologer Gene auf Grund ihrer funktionellen Entsprechung liefert ein Vergleichsversuch, bei dem die beiden homologen Gene in den miteinander verglichenen Mikroorganismen auf die gleiche Weise verändert werden und dann ermittelt wird, ob bei beiden Mikroorganismen die Siderophor-Synthese auf gleiche oder ähnliche Weise verändert wird. Ist dieses der Fall, so ist hierin eine Bestätigung des Sachverhaltes zu sehen, dass es sich um homologe Gene handelt. Auch solche funktionellen Entsprechungen sind in den Schutzbereich der Erfindung eingeschlossen.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist der Mikroorganismus dadurch gekennzeichnet, dass das Siderophor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Acinetobactin, Achromobactin, Acinetoferrin, Aerobactin, Albomycin, Alcaligin, Bisucaberin, Agrobactin, Alterobactin A, Alterobactin B, Amonabactin P, Amonabactin T, Amphibactin G, Anguibactin, Anthrachelin, Aquachelin D, Arthrobactin, Azotobactin D, Azoverdin, Bacillibactin, Corynebactin, Basidiochrom, Brucebactin, Carboxymycobactin,

Cepabactin, Chrysobactin, Coelichelin, Colibactin, Coprogen, Corrugatin, Desferrioxamin B, Desferrioxamin E, Desferrioxamin Et2, Desferrioxamin Et3, Dimerumsäure, Enterobactin, Enterochelin, Erythrobactin, Exochelin MN, Exochelin MS, Ferrichrom A, Ferrichrom C, Ferrichrome, Ferrichrysin, Ferricrocin, Ferrioxamin B, Ferrioxamin E, Ferrioxamine A1, A2, C, D1, D2, Fm G, H oder I, Ferrirhodin, Ferrirubin, Ferrithiocin, Fluvibactin, Fusarin C, Fusarin PM, Fusarin X, Fusarin Z, Fusigen, FusarininC, Gallichrom, Gonobactin, Hexahydroferrirhodin, Maduraferin, Marinobactin E, Marinobactine, Meningobactin, Methanobactin, Mugineinsäure, Mycobactin, Mycobactin J, Mycobactin P, Mycobactin S, Mycobactin T, Myxochelin A oder B, Nannochelin A, Nannochelin B, Nannochelin C, Neocoprogen I, Neocoprogen II, Nocobactin NA, Nocardamin, Ornibactin, Ornibactin C4, C6 oder C8, L-Parabactin, Petrobactin, Pseudobactin, Pseudobactin 7NSK2, Pseudobactin 7SR1, Pseudobactin A, Pseudobactin A 214, Pseudobactin M114, Pseudobactin PSB3, Pseudobactin St3, Pseudobactin , Pseudomonin, Putrebactin, Pyochelin A, Pyoverdin, Pyoverdin Pf12, Quinolobactin, Rhizobactin 1021, Rhizobactin DM4, Rhodotorulsäure, Rhizoferrin, Rhodobactin, Ruckerbactin, Salmochelin, Salmycin, Schizokinen, Staphylobactin, Staphyloferrin A, Staphyloferrin B, Tenacibactin A, B, C oder D, Triacetylfulvarinin, Triacetylfulvarinin C, Tetraglycyllferrichrom, Thioquinolobactin, Vanchrobactin, Vibriobactin, Vibrioferrin, Vulnibactin, Yersiniabactin. Eine Fur-regulierte (bzw. von einer jeweiligen Fur-Entsprechung) regulierte Biosynthese von einem dieser Siderophore lässt sich erfindungsgemäß besonders vorteilhaft verbessern. Üblicherweise kennzeichnet das Präfix „Desferri-“ die eisenfreie Form des Siderophors, wenn der ursprüngliche Name die eisenhaltige („Ferri-“) Form desselben Liganden beschreibt. Daher ist für jedes angegebene „Ferri“-Siderophor auch die jeweilige „Desferri“-Form mit umfasst und umgekehrt für jedes angegebene „Desferri“-Siderophor das jeweilige „Ferri“-Siderophor.

Die vorliegende Erfindung ist prinzipiell auf alle Mikroorganismen, insbesondere auf alle fermentierbaren Mikroorganismen, anwendbar und führt dazu, dass sich durch den Einsatz solcher Mikroorganismen Siderophore herstellen lassen, insbesondere durch die Fermentation der Mikroorganismen. Voraussetzung ist lediglich, dass der Mikroorganismus grundsätzlich zur Siderophorbildung befähigt ist und die Siderophor-Biosynthese durch Fur (bzw. eine jeweilige Entsprechung desselben in dem jeweiligen Mikroorganismus) reguliert ist. Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßer Mikroorganismus ein Bakterium, bevorzugt eines, das ausgewählt ist aus der Gruppe der Gattungen von Acinetobacter, Acinomadura, Actinomyces, Aerobacter, Aeromonas, Agrobacterium, Alteromonas, Anabaena, Arthrobacter, Azomonas, Azotobacter, Bacillus, Bordetella, Brucella, Burkholderia, Corynebacterium, Cupriavidus (Alcaligenes, Wautersia), Erwinia (Pectinobacterium), Escherichia, Klebsiella, Marinobacter, Methylosinus, Microbacterium, Mycobacterium, Nannocystis, Neisseria, Nocardia, Paracoccus, Pseudomonas, Ralstonia, Rhizobium, Rhodococcus, Saccharopolyspora, Salmonella, Typhimurium, Shewanella, Shigella, Staphylococcus, Stenotrophomonas, Streptomyces, Tenacibaculum, Vibrio und Yersinia, und weiter bevorzugt eines, das ausgewählt ist aus der Gruppe von Acinetobacter baumannii, Acinetobacter haemolyticus, Acinomadura madurae, Actinomyces subsp., Aerobacter, Aeromonas hydrophila, Agrobacterium tumefaciens, Alteromonas haloplanktis, Alteromonas luteoviolacea, Anabaena sp. ATCC 27898, Arthrobacter oxidans, Azomonas macrocytogenes, Azotobacter vinelandii, Bacillus

alcalophilus, *Bacillus globigii*, *Bacillus gibsonii*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus clausii*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus novalis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Brucella abortus*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia glumae*, *Burkholderia plantarii*, *Corynebacterium glutamicum*, *Cupriavidus necator* (*Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha*, *Wautersia eutropha*), *Erwinia carotovora*, *Erwinia chrysanthemi* (*Pectinobacterium chrysanthemi*), *Escherichia coli*, *Klebsiella planticola*, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, *Methylosinus trichosporium*, *Microbacterium flavescens*, *Mycobacterium neoaurum*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Nannocystis exedens*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Nocardia asteroides*, *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas B10*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas corrugata*, *Ralstonia leguminosarum*, *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum*, *Ralstonia pickettii*, *Rhizobium meliloti*, *Rhodococcus rhodochrous*, *Saccharopolyspora erythaea*, *Salmonella enterica* serovar, *Typhimurium*, *Shewanella putrefaciens*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus carnosus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces olivaceus*, *Streptomyces pilosus*, *Tenacibaculum* sp. A4K-17, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio anguillarum* serovar O2, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio salmonicida*, *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia ruckeri*. Ein besonders bevorzugtes Bakterium ist ausgewählt aus der Gruppe von *Escherichia coli*, *Klebsiella planticola*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus globigii*, *Bacillus gibsonii*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus clausii*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus novalis*, *Burkholderia glumae*, *Burkholderia plantarii*, *Staphylococcus carnosus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Arthrobacter oxidans*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Rhizobium leguminosarum*, *Ralstonia solanacearum* und *Anabaena* sp.

Solche Bakterien zeichnen sich durch kurze Generationszeiten und geringe Ansprüche an die Kultivierungsbedingungen aus. Dadurch können kostengünstige Verfahren zur Siderophorherstellung etabliert werden. Zudem ist für Bakterien in der Fermentationstechnik ein reichhaltiger Erfahrungsschatz vorhanden. Der für die Produktion eines bestimmten Siderophors unter den jeweiligen Fermentationsbedingungen am besten geeignete Bakterienstamm muss für die jeweiligen Bedingungen gesondert ermittelt werden. Relevante zu berücksichtigende Parameter sind beispielsweise die Fähigkeit zur Synthese des Siderophors selbst, die Art und Verfügbarkeit von Nährstoffquellen, das Fermentationsvolumen, die Medienzusammensetzung, die Sauerstoffversorgung, die Rührergeschwindigkeit, die Produktbildungsrate, der Zeitbedarf, usw. Die Mikroorganismen können hinsichtlich ihrer Anforderungen an die Kulturbedingungen verändert sein, andere oder zusätzliche Selektionsmarker aufweisen oder noch andere Produkte, beispielsweise Proteine, insbesondere rekombinante Proteine, exprimieren. Es kann sich insbesondere um solche Mikroorganismen handeln, die neben dem Siderophor transgen eines oder mehrere Enzyme exprimieren, das/die sie vorteilhafterweise wie das Siderophor in das den Mikroorganismus umgebende Medium sezernieren. Die erfindungsgemäßen Mikroorganismen werden in an sich bekannter Weise kultiviert und fermentiert,

beispielsweise in diskontinuierlichen oder kontinuierlichen Systemen. Im ersten Fall wird ein geeignetes Nährmedium mit den Mikroorganismen (Wirtszellen) beimpft und das Produkt, also das Siderophor, nach einem experimentell zu ermittelnden Zeitraum aus dem Medium geerntet. Kontinuierliche Fermentationen zeichnen sich durch Erreichen eines Fließgleichgewichts aus, in dem über einen vergleichsweise langen Zeitraum Zellen teilweise absterben aber auch nachwachsen und gleichzeitig Produkt aus dem Medium entnommen werden kann.

In einer weiteren Ausführungsform weist ein erfindungsgemäßer Mikroorganismus im Vergleich zu dem zweiten Mikroorganismus eine verstärkte Expression eines Gens auf, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus bli01183, bli01184, bli01185, bli01186, bli01187, bli01188, insbesondere wobei bli01183 eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die zu der in SEQ ID NO. 6 angegebenen Nukleinsäuresequenz zu mindestens 10% identisch ist, bli01184 eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die zu der in SEQ ID NO. 7 angegebenen Nukleinsäuresequenz zu mindestens 10% identisch ist, bli01185 eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die zu der in SEQ ID NO. 8 angegebenen Nukleinsäuresequenz zu mindestens 10% identisch ist, bli01186 eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die zu der in SEQ ID NO. 9 angegebenen Nukleinsäuresequenz zu mindestens 10% identisch ist, bli01187 eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die zu der in SEQ ID NO. 10 angegebenen Nukleinsäuresequenz zu mindestens 10% identisch ist, bli01188 eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die zu der in SEQ ID NO. 11 angegebenen Nukleinsäuresequenz zu mindestens 10% identisch ist. Bevorzugt umfasst das jeweilige Gen bli01183, bli01184, bli01185, bli01186, bli01187 bzw. bli01188 eine Nukleinsäuresequenz, die zu der jeweiligen in SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10 bzw. SEQ ID NO. 11 angegebenen Nukleinsäuresequenz zu mindestens 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% und ganz besonders bevorzugt zu 100% identisch ist.

Die genannten Gene bli01183 bis bli01188 beziehen sich auf *Bacillus licheniformis* und sind unter SEQ ID NOs. 6 bis 11 angegeben. Jedoch existieren jeweilige Entsprechungen dieser Gene (homologe Gene) auch in anderen Mikroorganismen, die für die Siderophorproduktion von Interesse sind. Diese erfindungsgemäße Ausgestaltung ist somit nicht auf *Bacillus licheniformis* beschränkt. Die den genannten *Bacillus licheniformis*-Genen entsprechenden Gene in anderen Mikroorganismen können wie vorstehend beschrieben auf Grund von Sequenzhomologien durch Sequenzvergleiche und/oder durch Vergleichsversuche ermittelt werden und sind im Rahmen der vorstehend angegebenen Mindest-Identitätswerte in die Erfindung eingeschlossen. Die in *Bacillus licheniformis* identifizierten Gene weisen die höchste Ähnlichkeit bzw. Identität auf zu den Genen des *rhb* Operons für die Synthese von Rhizobactin 1021 von *Sinorhizobium meliloti* (vgl. Persmark, M., P. Pittman, J.S. Buyer, B. Schwyn, P.R. Gill jr., and J.B. Neilands (1993): Isolation and structure of rhizobactin 1021, a siderophore from the

alfalfa symbiont *Rhizobium meliloti* 1021, J Am Chem Soc 115 (10): 3950-3956). Die von diesen Genen codierten Genprodukte sind notwendig für bzw. beteiligt an der Siderophor-Synthese. Daher ist es ergänzend möglich, durch die verstärkte Expression eines oder mehrerer dieser Gene die Siderophor-Synthese weiter zu steigern. In Mikroorganismen der Art *Bacillus licheniformis* sind die von diesen Genen codierten Genprodukte beispielsweise an der Synthese von Schizokinen beteiligt, so dass es möglich ist, durch die verstärkte Expression von einem oder mehreren dieser Gene die Synthese von Schizokinen in *Bacillus licheniformis* oder anderen Schizokinen-bildenden Mikroorganismen weiter zu steigern. In *Bacillus licheniformis* bilden diese Gene einen Gencluster (Operon). Das Operon umfasst eine Fur-Box in der genregulatorischen Sequenz (Operator-Region) des Operons, so dass die Siderophor-Synthese, insbesondere Schizokinen-Synthese, auch in *Bacillus licheniformis* unter der Kontrolle des Fur-Proteins steht und erfindungsgemäß beeinflusst werden kann, beispielsweise durch eine Deletion im fur-Gen bzw. durch eine Inaktivierung des fur-Gens allgemein. Dieses Operon bildet somit einen Teil des Fur-Regulons. Die Nukleinsäuresequenz dieser Fur-Box ist in SEQ ID NO. 5 angegeben.

Einen weiteren Gegenstand der Erfindung stellt ein Verfahren zur fermentativen Herstellung eines Siderophors durch Kultivierung eines erfindungsgemäßen Mikroorganismus dar. Ferner wurde überraschend festgestellt, dass *Bacillus licheniformis* selbst ohne Mutation des fur-Gens befähigt ist, Siderophore, insbesondere Schizokinen, zu bilden. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren zur fermentativen Herstellung eines Siderophors durch Kultivierung von *Bacillus licheniformis*, insbesondere eines Siderophors, das nicht Bacillibactin ist, bevorzugt eines Citrathydroxamates und ganz besonders bevorzugt um Schizokinen. Aus dem Stand der Technik ist bislang keine Siderophor-Synthese von *Bacillus licheniformis* bekannt. Lediglich ein Gencluster (Operon) wurde mit einer möglichen Synthese von Bacillibactin spekulativ in Verbindung gebracht, wobei dieses Operon nicht als funktionell offenbart ist. Eine reale Siderophor-Synthese von *Bacillus licheniformis* ist daher aus dem Stand der Technik nicht bekannt. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde nun aber ein Gencluster (Operon) identifiziert für die Synthese eines Siderophors, insbesondere eines, welches nicht Bacillibactin ist, insbesondere eines Citrathydroxamates, insbesondere Schizokinen, das die vorstehend beschriebenen Gene bli01183 bis bli01188 umfasst. Auf Grund ihrer Ähnlichkeit der Gene bli01183 bis bli01188 zu den Genen des rhb Operons für die Synthese von Rhizobactin 1021 von *Sinorhizobium meliloti* wurde ein Syntheseweg für ein Rhizobactin 1021-ähnliches Siderophor in *Bacillus licheniformis* identifiziert, wobei der Syntheseweg keine Reaktion umfasst, die von einem Enzym katalysiert wird, das der Acetyltransferase RhbG im Rhizobactin 1021-Syntheseweg (vgl. Lynch, D., J. O'Brien, T. Welch, P. Clarke, P.O. Cuiv, J.H. Crosa, and M. O'Connell (2001): Genetic organization of the region encoding regulation, biosynthesis, and transport of rhizobactin 1021, a siderophore produced by *Sinorhizobium meliloti*, J Bacteriol 183 (8):2576-2585, sowie Challis, G.L. (2005): A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases, Chem BioChem 6: 601-611) entspricht. In *Bacillus licheniformis* ist daher kein Homolog zu RhbG vorhanden. Im Rhizobactin 1021-Syntheseweg katalysiert dieses Enzym die Acetylierung von 1,3-Diaminopropan. In *Bacillus licheniformis* wird 1,3-Diaminopropan somit lediglich durch ein RhbD-Homolog modifiziert, so dass das

synthetisierte Siderophor symmetrisch und somit Schizokinen ist. Somit führt ein in *Bacillus licheniformis* modifizierter Rhizobactin 1021-Syntheseweg zur Synthese von Schizokinen (vgl. Figur 1). Ferner wurde für *Bacillus licheniformis* eine Synthese von Bacillibactin gefunden.

Mit erfindungsgemäßen Verfahren ist es möglich, Siderophore mit Mikroorganismen, insbesondere Bakterien, herzustellen, insbesondere in einer biotechnologischen Fermentation und insbesondere auch in Abwesenheit eines Eisenmangelzustands, also in Anwesenheit von ausreichend Eisen, insbesondere Eisen(III)-Ionen. Dadurch ermöglicht ein solches Verfahren eine verbesserte Siderophorausbeute in einer Fermentation, da die Fermentation unter nicht limitierenden Wachstumsbedingungen erfolgen kann. Vorteilhafterweise kommt in erfindungsgemäßen Verfahren ein erfindungsgemäßer Mikroorganismus zum Einsatz. *Bacillus licheniformis* kann auch direkt eingesetzt werden, wobei insbesondere auch *Bacillus licheniformis* durch eine Mutation des *fur*-Gens erfindungsgemäß modifiziert werden kann, um die Siderophor-Produktion weiter zu verbessern wie vorstehend beschrieben. Alle Sachverhalte, Gegenstände und Ausführungsformen, die für erfindungsgemäße Mikroorganismen beschrieben sind, sind auch auf die erfindungsgemäßen Verfahren anwendbar. Daher wird an dieser Stelle ausdrücklich auf die Offenbarung an entsprechender Stelle verwiesen mit dem Hinweis, dass diese Offenbarung auch für die vorstehenden erfindungsgemäßen Verfahren gilt.

Fermentationsverfahren sind aus dem Stand der Technik bekannt und stellen den eigentlichen großtechnischen Produktionsschritt dar, in der Regel gefolgt von einer geeigneten Aufreinigungsmethode des hergestellten Produktes, also des gebildeten Siderophors. Alle Fermentationsverfahren, die zur Herstellung des Siderophors geeignet sind, stellen Ausführungsformen dieses Erfindungsgegenstandes dar. Als geeignet ist ein solches Verfahren dann zu betrachten, wenn ein Siderophor gebildet wird. Bevorzugt ist das Siderophor eines der vorstehend genannten Siderophore. Fermentationsverfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, dass die Fermentation über eine Zulaufstrategie durchgeführt wird, kommen insbesondere in Betracht. Hierbei werden die Medienbestandteile, die durch die fortlaufende Kultivierung verbraucht werden, zugefüttert. Dadurch können Steigerungen sowohl in der Zelldichte als auch in der Biotrockenmasse und/oder der Menge des interessierenden Siderophors erreicht werden. Ferner kann die Fermentation alternativ oder ergänzend auch so gestaltet werden, dass unerwünschte Stoffwechselprodukte herausgefiltert oder durch Zugabe von Puffer oder jeweils passende Gegenionen neutralisiert werden. Für jedes herzustellende Siderophor sind eine Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten an Verfahrensschritten möglich. Das optimale Verfahren muss für jeden konkreten Einzelfall experimentell ermittelt werden.

Eine weitere Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass die Kultivierung in einem Medium erfolgt, das einen Bestandteil enthält, der ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Pflanzenmehl, Pflanzenextrakt, Proteinhydrolysat aus Pflanzen, Hefeextrakt, Fleischextrakt, insbesondere Rindfleisch-Extrakt, Caseinhydrolysat. Eine weitere Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass die Kultivierung in einem Medium

erfolgt, das 0,01-100 μ M und zunehmend bevorzugt 0,05-50 μ M, 0,1-20 μ M, 0,1-10 μ M, 0,5-1 μ M, 0,5-5 μ M und 0,8-1,5 μ M Eisenionen, bevorzugt Eisen(III)-Ionen, enthält.

Diese Ausführungsformen betreffen insbesondere den Einsatz komplexer Medien in erfindungsgemäßen Verfahren. Grundsätzlich können Kulturmedien fest oder flüssig sein, wobei bei Festmedien üblicherweise die Analyse der jeweiligen Mikroorganismen im Vordergrund steht, bei Flüssigmedien dagegen die Kultivierung der Mikroorganismen, auch in größeren Mengen, erfolgt, beispielsweise zur Erzeugung von Biomasse und/oder zur mikrobiellen Herstellung eines Produktes, insbesondere in einer Fermentation. Flüssigmedien sind daher erfindungsgemäß bevorzugt. Die Zusammensetzungen des Nährmediums sowie die Kulturbedingungen richten sich jeweils nach dem zu kultivierenden Mikroorganismus. Definierte Medien beinhalten eine genau bestimmte Anzahl und Menge an Inhaltsstoffen, die oftmals chemisch gereinigt werden, um Spuren von anderen Stoffen auszuschließen. Sie dienen häufig zur Selektion des Wachstums bestimmter Mikroorganismen. Minimalmedien als Sonderform der definierten Medien beinhalten nur die minimal nötigen Stoffe für das Wachstum der zu kultivierenden Mikroorganismen. Komplexe Medien umfassen dagegen Nährstoffe, deren Inhalte nicht genau bestimmt sind, wie zum Beispiel Pflanzenmehl, Pflanzenextrakt, Proteinhydrolysat aus Pflanzen, Hefeextrakt, Fleischextrakt, insbesondere Rindfleisch-Extrakt, Caseinhydrolysat. Sie werden am häufigsten verwendet und erlauben das Wachstum fast aller heterotrophen Mikroorganismen. Ein erfindungsgemäß besonders bevorzugtes Medium ist daher ein komplexes Flüssigmedium mit einem oder mehreren der vorstehend genannten Bestandteile. Der Einsatz eines solchen Mediums für die fermentative Siderophorproduktion, also die Siderophorproduktion durch Mikroorganismen in einem Bioreaktor, wird durch die vorliegende Erfindung signifikant verbessert. Bislang war es notwendig, die Mikroorganismen unter sorgfältig eingestellten Eisenmangelbedingungen zu kultivieren, um eine hinreichenden Produktausbeute zu erhalten, wobei gerade das Einstellen solcher Bedingungen schwierig ist. Erstens ist die Eisenversorgung der Mikroorganismen selbst wachstumslimitierend, so dass zwar ein Eisenmangelzustand erzeugt werden muss, aber dennoch so viel Eisen zur Verfügung gestellt werden muss, dass ein noch ausreichendes Wachstum der Mikroorganismen erfolgt. Zweitens ist beim Einsatz komplexer Medien bzw. Mediumsbestandteile eine genaue Einstellung des Eisengehaltes besonders schwierig, z.B. wegen Chargenschwankungen. Diese Nachteile werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung überwunden, so dass eine verbesserte Produktausbeute an Siderophoren auch in komplexen Medien und/oder auch in Anwesenheit von Eisen, insbesondere Eisen(III)-Ionen, erreicht werden kann. Beispielsweise zeigen die Mikroorganismen in komplexen Medien ohne Eisenmangel ein gutes Wachstum und regulieren die Siderophorproduktion trotz dieser guten Wachstumsbedingungen nicht herunter.

Erfindungsgemäße Mikroorganismen werden daher vorteilhaft in den beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt und werden in diesen Verfahren verwendet, um einen Stoff herzustellen. Konsequenterweise ist demnach ein weiterer Gegenstand der Erfindung die Verwendung eines vorstehend beschriebenen Mikroorganismus zur Herstellung eines Siderophors, vorzugsweise zur

Herstellung von Acinetobactin, Achromobactin, Acinetoferin, Aerobactin, Albomycin, Alcaligin, Bisucaberin, Agrobactin, Alterobactin A, Alterobactin B, Amonabactin P, Amonabactin T, Amphibactin G, Anguibactin, Anthrachelin, Aquachelin D, Arthrobactin, Azotobactin D, Azoverdin, Bacillibactin, Corynebactin, Basidiochrom, Brucebactin, Carboxymycobactin, Cepabactin, Chrysobactin, Coelichelin, Colibactin, Coprogen, Corrugatin, Desferrioxamin B, Desferrioxamin E, Desferrioxamin Et2, Desferrioxamin Et3, Dimerumsäure, Enterobactin, Enterochelin, Erythrobactin, Exochelin MN, Exochelin MS, Ferrichrom A, Ferrichrom C, Ferrichrome, Ferrichrysin, Ferricrocin, Ferrioxamin B, Ferrioxamin E, Ferrioxamine A1, A2, C, D1, D2, Fm G, H oder I, Ferrirhodin, Ferrirubin, Ferrithiocin, Fluvibactin, Fusarin C, Fusarin PM, Fusarin X, Fusarin Z, Fusigen, FusarininC, Gallichrom, Gonobactin, Hexahydroferrirhodin, Maduraferin, Marinobactin E, Marinobactine, Meningobactin, Methanobactin, Mugineinsäure, Mycobactin, Mycobactin J, Mycobactin P, Mycobactin S, Mycobactin T, Myxochelin A oder B, Nannochelin A, Nannochelin B, Nannochelin C, Neocoprogen I, Neocoprogen II, Nocobactin NA, Nocardamin, Ornibactin, Ornibactin C4, C6 oder C8, L-Parabactin, Petrobactin, Pseudobactin, Pseudobactin 7NSK2, Pseudobactin 7SR1, Pseudobactin A, Pseudobactin A 214, Pseudobactin M114, Pseudobactin PSB3, Pseudobactin St3, Pseudobactin , Pseudomonin, Putrebactin, Pyochelin A, Pyoverdin, Pyoverdin Pf12, Quinolobactin, Rhizobactin 1021, Rhizobactin DM4, Rhodotorulsäure, Rhizoferrin, Rhodobactin, Ruckerbactin, Salmochelin, Salmycin, Schizokinen, Staphylobactin, Staphyloferin A, Staphyloferin B, Tenacibactin A, B, C oder D, Triacetylfusarinin, Triacetylfusarinin C, Tetraglycyferrichrom, Thioquinolobactin, Vanchrobactin, Vibriobactin, Vibrioferrin, Vulnibactin, Yersiniabactin, ganz besonders bevorzugt zur Herstellung von Schizokinen. Da ferner *Bacillus licheniformis* bereits in seiner Wildtyp-Form zur Siderophor-Produktion geeignet ist, ist ein weiterer Gegenstand der Erfindung die Verwendung von *Bacillus licheniformis* zur Herstellung eines Siderophors, vorzugsweise zur Herstellung von Schizokinen und/oder Bacillibactin. Alternativ oder ergänzend wäre es möglich, *Bacillus* zur Herstellung eines Siderophors wie vorstehend angegeben zu verwenden.

Alle Sachverhalte, Gegenstände und Ausführungsformen, die für erfindungsgemäße Mikroorganismen bzw. erfindungsgemäße Verfahren beschrieben sind, sind auch auf erfindungsgemäße Verwendungen anwendbar. Daher wird an dieser Stelle ausdrücklich auf die Offenbarung an entsprechender Stelle verwiesen mit dem Hinweis, dass diese Offenbarung auch für die vorstehenden erfindungsgemäßen Verwendungen gilt.

Beispiele:

Alle molekularbiologischen Arbeitsschritte folgen Standardmethoden, wie sie beispielsweise in dem Handbuch von Fritsch, Sambrook und Maniatis „Molecular cloning: a laboratory manual“, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989, oder vergleichbaren einschlägigen Werken angegeben sind. Enzyme, Baukästen (Kits) und Geräte wurden nach den Angaben der jeweiligen Hersteller eingesetzt.

Beispiel 1: Herstellung einer Derepressionsmutante für Siderophorproduktion

Mithilfe molekularbiologischer Standardverfahren wurde in *Bacillus licheniformis* der für das Fur-Protein codierende Bereich im *fur*-Gen um 404 Basenpaare verkürzt (vgl. auch Figur 2). Die entstandene Fusionsstelle weist die Sequenz des verwendeten Fusionsprimers (bzw. seines Gegenstranges) gemäß SEQ ID NO. 3 auf, wobei die Deletion nach Position 15 gemäß SEQ ID NO. 3 vorhanden ist.

Beispiel 2: Verbesserung der Siderophorproduktion durch Mutation des *fur*-Gens

Die in Beispiel 1 hergestellte *fur*-Mutante von *Bacillus licheniformis* wurde vergleichend zum Ausgangsstamm hinsichtlich ihrer Siderophorproduktion im CAS-Flüssig- und im Eisenperchlorat-Test untersucht. Wie Figur 3 verdeutlicht weist die *fur*-Mutante eine deutlich verbesserte Siderophor-Produktion auf in Anwesenheit von 10 µM zugesetztem Eisen(III)chlorid (Figur 3 A) im Vergleich mit einem Kontrollansatz ohne zugesetztes Eisen in Eisenmangelmedium (Figur 3 B). Ferner weist die *fur*-Mutante eine höhere Endzellichte auf, was hinsichtlich der Siderophor-Ausbeute ebenfalls vorteilhaft ist.

Beispiel 3: Siderophorproduktion mit *Bacillus licheniformis* Wildtyp-Stämmen

Zwei *Bacillus licheniformis* Stämme wurden in Eisenmangelmedium analog zu May et al. (vgl. May, J.J., T.M. Wendrich, and M.A. Marahiel (2001): The *dhb* operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin, J Biol Chem 276 (10): 7209-7217) herangezogen und bis in die stationäre Phase wachsen gelassen. Der zellfreie Überstand nach Ernte wurde mehrfach mit Butanol im Scheidetrichter extrahiert, die vereinigten Butanolphasen im Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit einem kleinen Volumen Methanol digeriert. Die methanolische Lösung wurde zur massenspektrometrischen Untersuchung eingesetzt, und es wurden Massensignale erhalten, die dem Schizokinen sowie dem Bacillibactin entsprechen:

Schizokinen gemessen: $m/z = 421,08$ ($M+H^+$), berechnete monoisotopische Masse von Schizokinen 420,19;

Bacillibactin gemessen: $m/z = 882,94$, berechnete monoisotopische Masse für Bacillibactin 882,26.

Mit einem käuflich erworbenen Schizokinenstandard (Fa. EMC Microcollections, Tübingen) wurde das gleiche Ergebnis für Schizokinen gefunden.

Die methanolische Lösung wurde eingedampft, der Rückstand in Wasser aufgenommen und im CAS-Flüssig-Test sowie im Hydroxamat-Test untersucht. Beide Reaktionen verliefen positiv, wodurch eine

Hydroxamat-Siderophorsynthese nachgewiesen wurde. Ferner ergaben die Stämme auf CAS-Agar (vgl. Schwyn & Neilands (1987)) einen typischen gelb-orangen Halo als weiteren Siderophorsynthesenachweis.

Beschreibung der Figuren

Figur 1: (A) Darstellung des Schizokinen-Syntheseweges in *Bacillus licheniformis*. Die über den Pfeilen angegebenen Proteine zeigen die Enzyme von *Bacillus licheniformis* („BLi“) sowie jeweilige hierzu homologe Enzyme des Aerobactin-Syntheseoperons (oben, beispielsweise „luc“) sowie des Rhizobactin 1021-Syntheseoperons (mittig, beispielsweise „Rhb“), die die jeweilige Reaktion katalysieren. (B) Darstellung des Schizokinen-Syntheseoperons von *Bacillus licheniformis*.

Figur 2: Schematische Darstellung der fur-Deletion gemäß Beispiel 1. Oben: Nach Transformation von *Bacillus licheniformis* mit dem Vektor (Plasmid 1) enthält das Bakterium noch das fur-Gen. Mitte: Nach erfolgter Rekombination wurde ein Abschnitt des fur-Gens aus der genomischen DNA entfernt und in das Plasmid 2 integriert. Unten: Genomstruktur nach erfolgter Deletion des fur-Gens.

Figur 3: Vergleich der Siderophor-Produktion der *Bacillus licheniformis* fur-Mutante mit dem *Bacillus licheniformis*-Ausgangsstamm in Anwesenheit von 10 µM Eisen(III)-Ionen (A) beziehungsweise in einem Kontrollansatz ohne zugesetztes Eisen in Eisenmangelmedium (B). Die fur-Mutante weist eine deutlich verbesserte Siderophor-Produktion auf in Anwesenheit von 10 µM zugesetztem Eisen(III)chlorid. Ferner weist die fur-Mutante eine höhere Endzellichte auf, was hinsichtlich der Siderophor-Ausbeute ebenfalls vorteilhaft ist.

Figur 4: Strukturformeln der von *Bacillus licheniformis* produzierten Siderophore. (A) Schizokinen. (B) Bacillibactin.

Sequenzprotokoll - freier Text:

Betreffend SEQ ID NO. 3:

entstandene Fusionsstelle gemäß Beispiel 1.

Patentansprüche

1. Siderophor-bildender Mikroorganismus, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroorganismus durch mindestens eine Mutation im fur-Gen eine verminderte Expression dieses Gens aufweist im Vergleich zu einem zweiten Mikroorganismus, der diese Mutation nicht aufweist.
2. Mikroorganismus nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroorganismus ein nicht natürlicher Mikroorganismus ist.
3. Mikroorganismus nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der zweite Mikroorganismus ein natürlicher Mikroorganismus ist.
4. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass er aus dem zweiten Mikroorganismus durch mindestens eine Deletion und/oder mindestens eine Insertion und/oder Substitution von mindestens einem Basenpaar im fur-Gen erhalten werden kann.
5. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass er in Gegenwart von mindestens 0,1µM und zunehmend bevorzugt von mindestens 0,5µM, 1µM, 2µM, 3µM, 4µM, 5µM und 10µM Eisen(III)-Ionen eine gegenüber dem zweiten Mikroorganismus gesteigerte Siderophor-Synthese aufweist.
6. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das fur-Gen eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die zu der in SEQ ID NO. 1 angegebenen Nukleinsäuresequenz mindestens zu 50% identisch ist.
7. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Siderophor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Acinetobactin, Achromobactin, Acinetoferin, Aerobactin, Albomycin, Alcaligin, Bisucaberin, Agrobactin, Alterobactin A, Alterobactin B, Amonabactin P, Amonabactin T, Amphibactin G, Anguibactin, Anthrachelin, Aquachelin D, Arthrobactin, Azotobactin D, Azoverdin, Bacillibactin, Corynebactin, Basidiochrom, Brucebactin, Carboxymycobactin, Cepabactin, Chrysobactin, Coelichelin, Colibactin, Coprogen, Corrugatin, Desferrioxamin B, Desferrioxamin E, Desferrioxamin Et2, Desferrioxamin Et3, Dimerumsäure, Enterobactin, Enterochelin, Erythrobactin, Exochelin MN, Exochelin MS, Ferrichrom A, Ferrichrom C, Ferrichrome, Ferrichrysin, Ferricrocin, Ferrioxamin B, Ferrioxamin E, Ferrioxamine A1, A2, C, D1, D2, Fm G, H oder I, Ferrirhodin, Ferrirubin, Ferrithiocin, Fluvibactin, Fusarin C, Fusarin PM, Fusarin X, Fusarin Z, Fusigen, FusarininC, Gallichrom, Gonobactin, Hexahydroferrirhodin, Maduraferin, Marinobactin E, Marinobactine, Meningobactin, Methanobactin, Mugineinsäure, Mycobactin,

Mycobactin J, Mycobactin P, Mycobactin S, Mycobactin T, Myxochelin A oder B, Nannochelin A, Nannochelin B, Nannochelin C, Neocoprogen I, Neocoprogen II, Nocobactin NA, Nocardamin, Ornibactin, Ornibactin C4, C6 oder C8, L-Parabactin, Petrobactin, Pseudobactin, Pseudobactin 7NSK2, Pseudobactin 7SR1, Pseudobactin A, Pseudobactin A 214, Pseudobactin M114, Pseudobactin PSB3, Pseudobactin St3, Pseudobactin , Pseudomonin, Putrebactin, Pyochelin A, Pyoverdin, Pyoverdin Pf12, Quinolobactin, Rhizobactin 1021, Rhizobactin DM4, Rhodotorulsäure, Rhizoferrin, Rhodobactin, Ruckerbactin, Salmochelin, Salmycin, Schizokinen, Staphylobactin, Staphyloferrin A, Staphyloferrin B, Tenacibactin A, B, C oder D, Triacetylfusarinin, Triacetylfusarinin C, Tetraglycyllferrichrom, Thioquinolobactin, Vanchrobactin, Vibriobactin, Vibrioferin, Vulnibactin, Yersiniabactin.

8. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, er ein Bakterium ist, bevorzugt eines, das ausgewählt ist aus der Gruppe der Gattungen von Acinetobacter, Acinomadura, Actinomyces, Aerobacter, Aeromonas, Agrobacterium, Alteromonas, Anabaena, Arthrobacter, Azomonas, Azotobacter, Bacillus, Bordetella, Brucella, Burkholderia, Corynebacterium, Cupriavidus (Alcaligenes, Wautersia), Erwinia (Pectinobacterium), Escherichia, Klebsiella, Marinobacter, Methylosinus, Microbacterium, Mycobacterium, Nannocystis, Neisseria, Nocardia, Paracoccus, Pseudomonas, Ralstonia, Rhizobium, Rhodococcus, Saccharopolyspora, Salmonella, Typhimurium, Shewanella, Shigella, Staphylococcus, Stenotrophomonas, Streptomyces, Tenacibaculum, Vibrio und Yersinia.

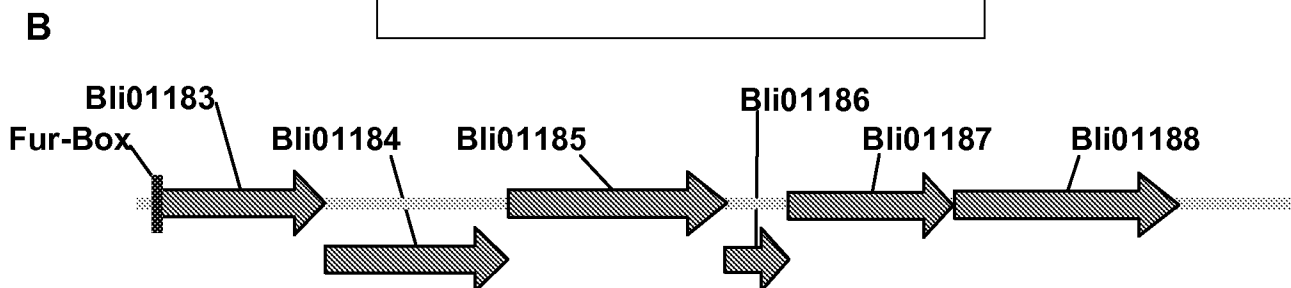
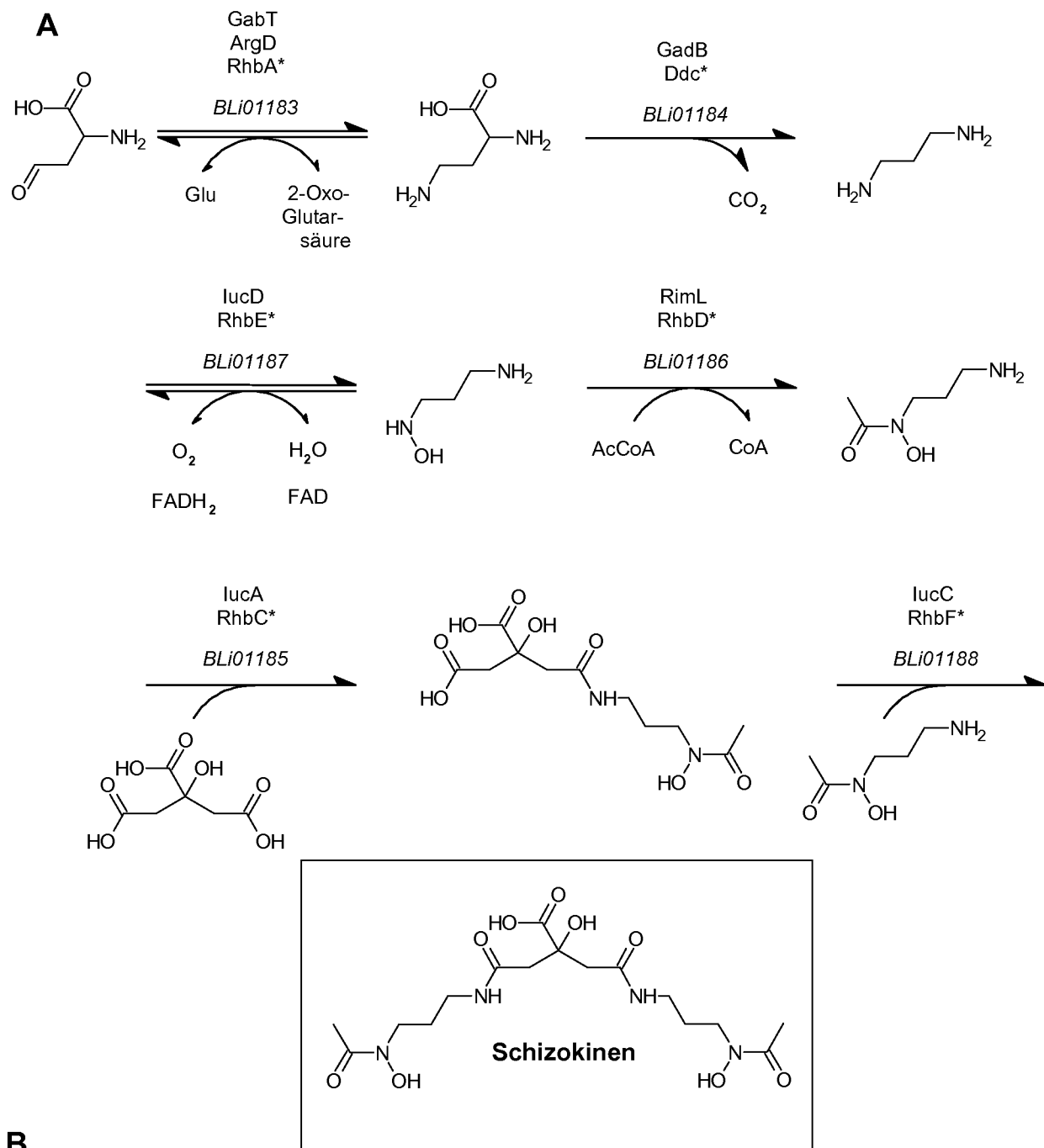
9. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass er im Vergleich zu dem zweiten Mikroorganismus eine verstärkte Expression eines Gens aufweist, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus bli01183, bli01184, bli01185, bli01186, bli01187, bli01188, insbesondere wobei
 - bli01183 eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die zu der in SEQ ID NO. 6 angegebenen Nukleinsäuresequenz zu mindestens 10% identisch ist,
 - bli01184 eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die zu der in SEQ ID NO. 7 angegebenen Nukleinsäuresequenz zu mindestens 10% identisch ist,
 - bli01185 eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die zu der in SEQ ID NO. 8 angegebenen Nukleinsäuresequenz zu mindestens 10% identisch ist,
 - bli01186 eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die zu der in SEQ ID NO. 9 angegebenen Nukleinsäuresequenz zu mindestens 10% identisch ist,
 - bli01187 eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die zu der in SEQ ID NO. 10 angegebenen Nukleinsäuresequenz zu mindestens 10% identisch ist,
 - bli01188 eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die zu der in SEQ ID NO. 11 angegebenen Nukleinsäuresequenz zu mindestens 10% identisch ist.

10. Verfahren zur fermentativen Herstellung eines Siderophors durch Kultivierung eines Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
11. Verfahren zur fermentativen Herstellung eines Siderophors durch Kultivierung von *Bacillus licheniformis*.
12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Kultivierung in einem Medium erfolgt, das einen Bestandteil enthält, der ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Pflanzenmehl, Pflanzenextrakt, Proteinhydrolysat aus Pflanzen, Hefeextrakt, Fleischextrakt, insbesondere Rindfleisch-Extrakt, Caseinhydrolysat.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Kultivierung in einem Medium erfolgt, das 0,01-100µM und zunehmend bevorzugt 0,05-50µM, 0,1-20µM, 0,1-10µM, 0,5-1µM, 0,5-5µM und 0,8-1,5µM Eisenionen, bevorzugt Eisen(III)-Ionen, enthält.
14. Verwendung eines Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Herstellung eines Siderophors, vorzugsweise zur Herstellung von Acinetobactin, Achromobactin, Acinetoferrin, Aerobactin, Albomycin, Alcaligin, Bisucaberin, Agrobactin, Alterobactin A, Alterobactin B, Amonabactin P, Amonabactin T, Amphibactin G, Anguibactin, Anthrachelin, Aquachelin D, Arthrobactin, Azotobactin D, Azoverdin, Bacillibactin, Corynebactin, Basidiochrom, Brucebactin, Carboxymycobactin, Cepabactin, Chrysobactin, Coelichelin, Colibactin, Coprogen, Corrugin, Desferrioxamin B, Desferrioxamin E, Desferrioxamin Et2, Desferrioxamin Et3, Dimerumsäure, Enterobactin, Enterochelin, Erythrobactin, Exochelin MN, Exochelin MS, Ferrichrom A, Ferrichrom C, Ferrichrome, Ferrichrysin, Ferricrocin, Ferrioxamin B, Ferrioxamin E, Ferrioxamine A1, A2, C, D1, D2, Fm G, H oder I, Ferrirhodin, Ferrirubin, Ferrithiocin, Fluvibactin, Fusarin C, Fusarin PM, Fusarin X, Fusarin Z, Fusigen, FusarininC, Gallichrom, Gonobactin, Hexahydroferrirhodin, Maduraferin, Marinobactin E, Marinobactine, Meningobactin, Methanobactin, Mugineinsäure, Mycobactin, Mycobactin J, Mycobactin P, Mycobactin S, Mycobactin T, Myxochelin A oder B, Nannochelin A, Nannochelin B, Nannochelin C, Neocoprogen I, Neocoprogen II, Nocobactin NA, Nocardamin, Ornibactin, Ornibactin C4, C6 oder C8, L-Parabactin, Petrobactin, Pseudobactin, Pseudobactin 7NSK2, Pseudobactin 7SR1, Pseudobactin A, Pseudobactin A 214, Pseudobactin M114, Pseudobactin PSB3, Pseudobactin St3, Pseudobactin , Pseudomonin, Putrebactin, Pyochelin A, Pyoverdin, Pyoverdin Pf12, Quinolobactin, Rhizobactin 1021, Rhizobactin DM4, Rhodotorulsäure, Rhizoferrin, Rhodobactin, Ruckerbactin, Salmochelin, Salmycin, Schizokinen, Staphylobactin, Staphyloferrin A, Staphyloferrin B, Tenacibactin A, B, C oder D, Triacetylfusarinin, Triacetylfusarinin C, Tetraglycyferrichrom, Thioquinolobactin, Vanchrobactin, Vibriobactin, Vibrioferrin, Vulnibactin, Yersiniabactin

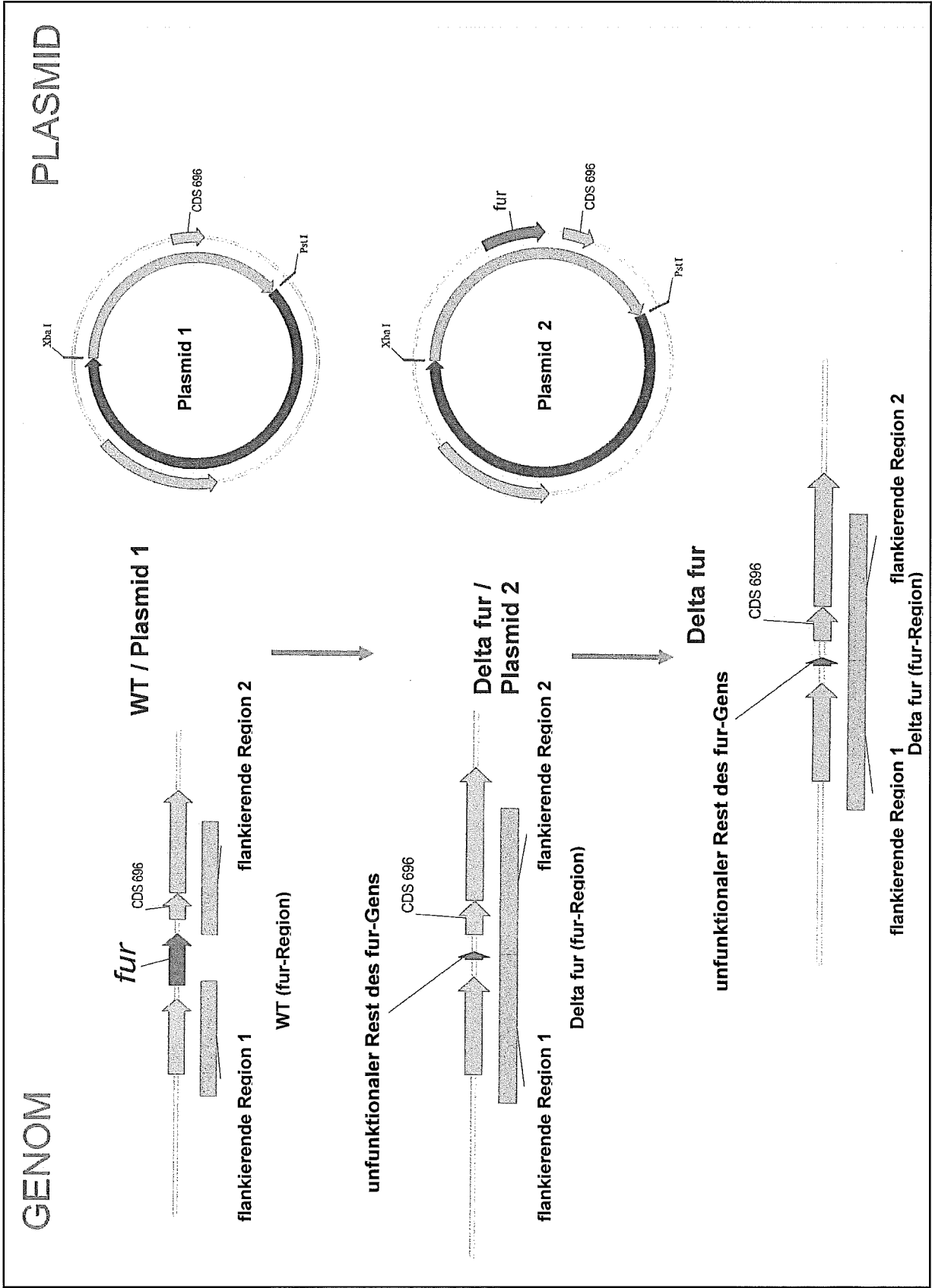
15. Verwendung von *Bacillus licheniformis* zur Herstellung eines Siderophors, vorzugsweise zur Herstellung von Schizokinen und/oder Bacillibactin.

Figur 1

1 / 4

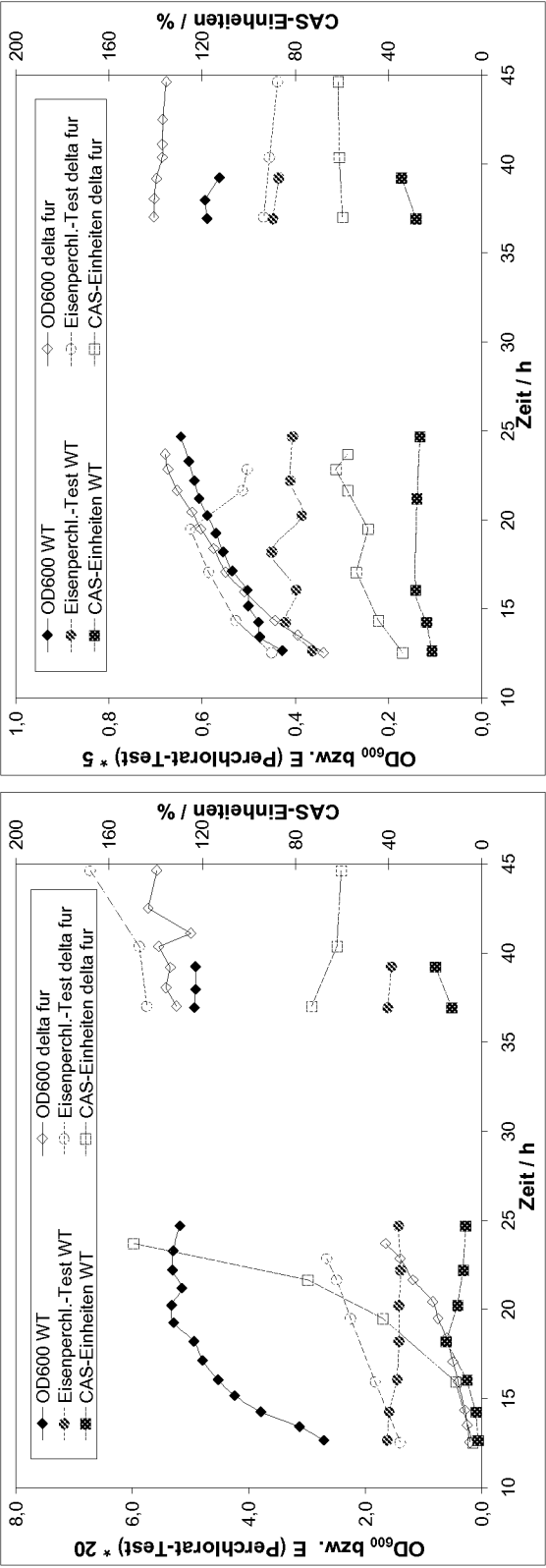


Figur 2



Figur 3

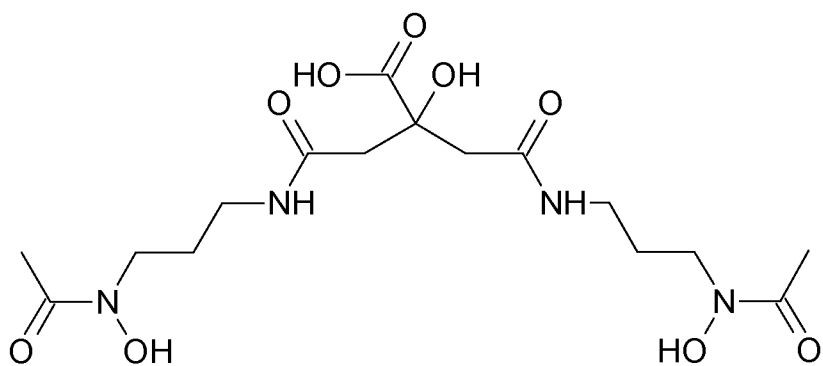
3 / 4



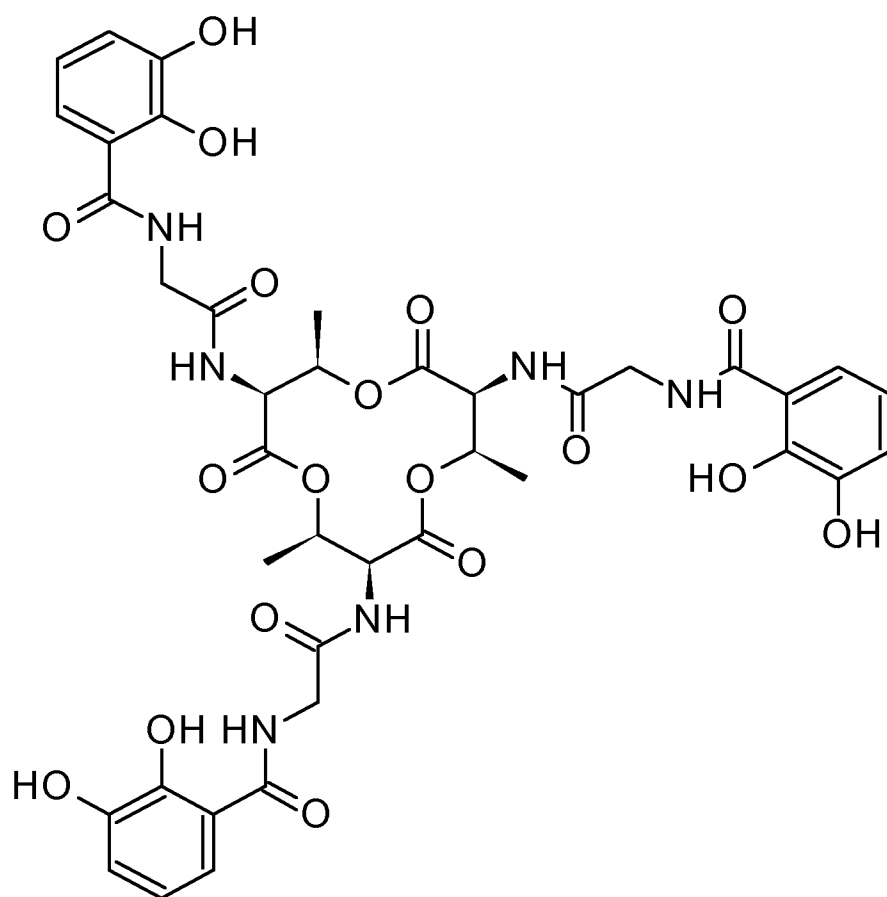
Figur 4

4 / 4

A



B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/051464

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/32 C12P7/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOHNOVA ANDREA ET AL: "Fur mutants of Pseudomonas aeruginosa PA01: Phenotypic characterization in terms of iron-dependent pattern of deregulation of pyoverdinin synthesis." BIOTECHNOLOGY LETTERS, vol. 25, no. 3, February 2003 (2003-02), pages 235-239, XP002578068 ISSN: 0141-5492	1-5,7,8, 10,14
Y	figure 1; tables 1,2 ----- -/--	6,9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 April 2010

Date of mailing of the international search report

04/05/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stolz, Beat

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/051464

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BRICKMAN TIMOTHY J ET AL: "Bordetella pertussis fur Gene Restores Iron Repressibility of Siderophore and Protein Expression to Deregulated Bordetella bronchiseptica Mutants" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 177, no. 1, 1995, pages 268-270, XP002578069 ISSN: 0021-9193 page 268, right-hand column; figure 1 -----	1-5,7,8, 10,14
X	RAMAKRISHNAN GIRIJA ET AL: "fsIE is necessary for siderophore-mediated iron acquisition in Francisella tularensis Schu S4" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 190, no. 15, August 2008 (2008-08), pages 5353-5361, XP002578070 ISSN: 0021-9193 figure 1b, -----	1-5,7,8, 10,14
X	WOO SANG-LIN ET AL: "Purification and characterization of the siderophore from Bacillus licheniformis K11, a multi-functional plant growth promoting rhizobacterium" KOREAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 35, no. 2, June 2007 (2007-06), pages 128-134, XP002578071 ISSN: 1598-642X figure 1; tables 1,2 -----	11-13,15
Y	-----	6,9
X	KR 100 747 701 B1 (IND ACADEMIC COOP [KR]) 2 August 2007 (2007-08-02) page 8 -----	11-13,15
A	CROSA JORGE H ET AL: "Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria" MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, vol. 66, no. 2, June 2002 (2002-06), pages 223-249, XP002578072 ISSN: 1092-2172 the whole document -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2010/051464

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
KR 100747701	B1	02-08-2007	NONE

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2010/051464

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

INV. C07K14/32 C12P7/00

ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

C07K C12P

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	JOHNOVA ANDREA ET AL: "Für mutants of Pseudomonas aeruginosa PA01: Phenotypic characterization in terms of iron-dependent pattern of deregulation of pyoverdinin synthesis." BIOTECHNOLOGY LETTERS, Bd. 25, Nr. 3, Februar 2003 (2003-02), Seiten 235-239, XP002578068 ISSN: 0141-5492	1-5,7,8, 10,14
Y	Abbildung 1; Tabellen 1,2 ----- -/--	6,9

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. April 2010

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

04/05/2010

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Stolz, Beat

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2010/051464

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BRICKMAN TIMOTHY J ET AL: "Bordetella pertussis fur Gene Restores Iron Repressibility of Siderophore and Protein Expression to Deregulated Bordetella bronchiseptica Mutants" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 177, Nr. 1, 1995, Seiten 268-270, XP002578069 ISSN: 0021-9193 Seite 268, rechte Spalte; Abbildung 1 -----	1-5,7,8, 10,14
X	RAMAKRISHNAN GIRIJA ET AL: "fsIE is necessary for siderophore-mediated iron acquisition in Francisella tularensis Schu S4" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 190, Nr. 15, August 2008 (2008-08), Seiten 5353-5361, XP002578070 ISSN: 0021-9193 Abbildung 1b, -----	1-5,7,8, 10,14
X	WOO SANG-LIN ET AL: "Purification and characterization of the siderophore from Bacillus licheniformis K11, a multi-funetional plant growth promoting rhizobacterium" KOREAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, Bd. 35, Nr. 2, Juni 2007 (2007-06), Seiten 128-134, XP002578071 ISSN: 1598-642X Abbildung 1; Tabellen 1,2 -----	11-13,15
Y	KR 100 747 701 B1 (IND ACADEMIC COOP [KR]) 2. August 2007 (2007-08-02) Seite 8 -----	6,9
X	CROSA JORGE H ET AL: "Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria" MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, Bd. 66, Nr. 2, Juni 2002 (2002-06), Seiten 223-249, XP002578072 ISSN: 1092-2172 das ganze Dokument -----	11-13,15
A		1-15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2010/051464

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
KR 100747701	B1	02-08-2007	KEINE