



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 29 971 T2** 2007.05.16

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 204 755 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 29 971.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/22874**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 955 772.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/012833**

(86) PCT-Anmeldetag: **18.08.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **22.02.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **15.05.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **09.08.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **16.05.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/52 (2006.01)**

C12N 15/20 (2006.01)

C12P 7/18 (2006.01)

C12N 9/04 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

149534 P 18.08.1999 US

(73) Patentinhaber:

**E.I. DuPont de Nemours and Co., Wilmington, Del.,
US; Genencor International, Inc., Palo Alto, Calif.,
US**

(74) Vertreter:

derzeit kein Vertreter bestellt

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**EMPTAGE, Mark, Wilmington, DE 19810, US;
HAYNIE, Sharon, Philadelphia, PA 19106, US;
LAFFEND, Lisa, Claymont, DE 19703, US; PUCCI,
Jeff, Palo Alto, CA 94303, US; WHITED, Greg,
Belmont, CA 94002, US**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR BIOLOGISCHEN HERSTELLUNG VON 1,3-PROPANDIOL**

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

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

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Diese Erfindung betrifft ein Verfahren für die biologische Umwandlung einer fermentierbaren Kohlenstoffquelle in 1,3-Propandiol durch einen einzigen Mikroorganismus.

Hintergrund

[0002] 1,3-Propandiol ist ein Monomer mit potentieller Verwendbarkeit bei der Herstellung von Polyesterfasern und bei der Herstellung von Polyurethanen und cyclischen Verbindungen.

[0003] Eine Vielfalt von chemischen Wegen zu 1,3-Propandiol ist bekannt. Zum Beispiel kann Ethylenoxid über einen Katalysator in Anwesenheit von Phosphin, Wasser, Kohlenmonoxid, Wasserstoff und einer Säure durch die katalytische Lösungsphasenhydratation von Acrolein und nachfolgende Reduktion, oder aus Verbindungen wie beispielsweise Glycerol, umgesetzt in Anwesenheit von Kohlenmonoxid und Wasserstoff über Katalysatoren mit Atomen aus der Gruppe VIII des Periodensystems, in 1,3-Propandiol umgewandelt werden. Obwohl es möglich ist, 1,3-Propandiol durch diese Verfahren zu erzeugen, sind sie kostspielig und erzeugen Abfallströme, die Umweltschmutzstoffe enthalten.

[0004] Es ist seit über einem Jahrhundert bekannt, daß 1,3-Propandiol aus der Fermentation von Glycerol erzeugt werden kann. Bakterienstämme, die imstande sind, 1,3-Propandiol zu erzeugen, sind zum Beispiel in den Gruppen Citrobacter, Clostridium, Enterobacter, Ilyobacter, Klebsiella, Lactobacillus und Pelobacter gefunden worden. In jedem untersuchten Fall wird Glycerol in einer zweistufigen Enzym-katalysierten Reaktionssequenz in 1,3-Propandiol umgewandelt. Im ersten Schritt katalysiert eine Dehydratase die Umwandlung von Glycerol in 3-Hydroxypropionaldehyd (3-HPA) und Wasser, Gleichung 1. Im zweiten Schritt wird 3-HPA durch eine NAD⁺-verknüpfte Oxidoreductase zu 1,3-Propandiol reduziert, Gleichung 2. Das 1,3-Propandiol wird nicht weiter metabolisiert und sammelt sich infolgedessen

Glycerol → 3-HPA + H₂O (Gleichung 1)

3-HPA + NADH + H⁺ → 1,3-Propandiol + NAD⁺ (Gleichung 2)

in den Medien an. Die Gesamtreaktion verbraucht ein reduzierendes Äquivalent in der Form eines Cofaktors, reduziertes β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH), welches zu Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD⁺) oxidiert wird.

[0005] In *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* und *Clostridium pasteurianum* befinden sich die Gene, codierend die drei strukturellen Untereinheiten von Glycerol-Dehydratase (dhaB1–3 oder dhaB, C und E), angrenzend an ein Gen, codierend eine spezielle 1,3-Propandiol-Oxidoreductase (dhaT) (siehe [Fig. 1](#)). Obwohl sich die genetische Organisation bei diesen Mikroorganismen etwas unterscheidet, sind diese Gene in einer Gruppe gesammelt, welche auch orfX und orfZ (Gene, codierend einen Dehydratase-Reaktivierungsfaktor für Glycerol-Dehydratase) ebenso wie orfY und orfW (Gene unbekannter Funktion) umfaßt. Es ist bekannt, daß die spezifischen 1,3-Propandiol-Oxidoreductasen (dhaT's) dieser Mikroorganismen zu der Familie von Typ-III-Alkohol-Dehydrogenasen gehören; jede zeigt ein konserviertes Eisenbindungsmotiv und hat eine Präferenz für die NAD⁺/NADH-verknüpfte gegenseitige Umwandlung von 1,3-Propandiol und 3-HPA. Jedoch wird die NAD⁺/HADH-verknüpfte gegenseitige Umwandlung von 1,3-Propandiol und 3-HPA auch durch Alkohol-Dehydrogenasen katalysiert, welche nicht speziell mit Dehydratase-Enzymen verknüpft sind (zum Beispiel Pferdeleber- und Bäckerhefe-Alkohol-Dehydrogenasen (E.C. 1.1.1.1)), wenn auch mit weniger effizienten kinetischen Parametern. Glycerol-Dehydratase (E.C. 4.2.1.30) und Diol[1,2-propandiol]-Dehydratase [E.C. 4.2.1.28] sind verwandte, aber unterschiedliche Enzyme, die durch unterschiedliche Gene codiert werden. Diol-Dehydratase-Gene aus *Klebsiella oxytoca* und *Salmonella typhimurium* sind Glycerol-Dehydratase-Genen ähnlich und sind in einer Gruppe versammelt, welche Gene analog zu orfX und orfZ umfaßt (Daniel et al., FEMS Microbiol. Rev. 22, 553 (1999); Toraya und Mori, J. Biol. Chem. 274, 3372 (1999); GenBank AF026270).

[0006] Die Herstellung von 1,3-Propandiol aus Glycerol wird im allgemeinen unter anaeroben Bedingungen unter Verwendung von Glycerol als der alleinigen Kohlenstoffquelle und in Abwesenheit von anderen exogenen reduzierenden äquivalenten Akzeptoren durchgeführt. Unter diesen Bedingungen ist, in z.B. Stämmen von *Citrobacter*, *Clostridium* und *Klebsiella*, ein paralleler Weg für Glycerol wirksam, welcher zuerst die Oxidation von Glycerol zu Dihydroxyaceton (DHA) durch eine NAD⁺- (oder NADP⁺-)verknüpfte Glycerol-Dehydrogenase

beinhaltet, Gleichung 3. Die DHA wird, folgend der Phosphorylierung zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) durch eine DHA-Kinase (Gleichung 4),



für Biosynthese und zum Unterstützen der ATP-Erzeugung über z.B. Glycolyse verfügbar. Im Gegensatz zu dem 1,3-Propandiol-Weg kann dieser Weg Kohlenstoff und Energie für die Zelle bereitstellen und erzeugt mehr NADH als er verbraucht.

[0007] In *Klebsiella pneumoniae* und *Citrobacter freundii* werden die Gene, die die funktionell verknüpften Aktivitäten von Glycerol-Dehydratase (dhaB), 1,3-Propandiol-Oxidoreductase (dhaT), Glycerol-Dehydrogenase (dhaD) und Dihydroxyaceton-Kinase (dhaK) codieren, durch das dha-Regulon eingeschlossen. Das dha-Regulon in *Klebsiella pneumoniae* und *Citrobacter freundii* schließt auch ein Gen ein, das ein transkriptionelles Aktivatorprotein (dhaR) codiert. Die dha-Regulone aus *Citrobacter* und *Klebsiella* sind in *Escherichia coli* exprimiert worden und es ist gezeigt worden, daß sie Glycerol in 1,3-Propandiol umwandeln.

[0008] Weder die chemischen noch die biologischen Methoden, die vorstehend für die Herstellung von 1,3-Propandiol beschrieben wurden, sind für industrielle Großproduktion gut geeignet, da die chemischen Verfahren energieintensiv sind und die biologischen Verfahren auf relativ niedrigen Titer von dem kostspieligen Ausgangsmaterial Glycerol begrenzt sind. Diese Nachteile könnten mit einem Verfahren, das geringen Energieeinsatz und ein preisgünstiges Ausgangsmaterial wie beispielsweise Kohlenhydrate oder Zucker erfordert, oder durch Erhöhen der metabolischen Effizienz eines Glycerolverfahrens überwunden werden. Die Entwicklung jedes Verfahrens erfordert die Fähigkeit, die genetische Maschinerie zu manipulieren, die für die Umwandlung von Zuckern in Glycerol und von Glycerol in 1,3-Propandiol verantwortlich ist.

[0009] Biologische Verfahren für die Herstellung von Glycerol sind bekannt. Die überwiegende Mehrheit von Glycerolerzeugern sind Hefen, aber einige Bakterien, andere Pilze und Algen sind ebenfalls bekannt. Sowohl Bakterien als auch Hefen erzeugen Glycerol durch Umwandeln von Glucose oder anderen Kohlehydraten über den Fructose-1,6-bisphosphat-Weg in der Glycolyse oder den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg, wohingegen bestimmte Algen gelöstes Kohlendioxid oder Bicarbonat in den Chloroplasten in die 3-Kohlenstoff-Zwischenverbindungen des Calvin-Zyklus umwandeln. In einer Reihe von Schritten wird die 3-Kohlenstoff-Zwischenverbindung, Phosphoglycerinsäure, in Glyceraldehyd-3-phosphat umgewandelt, welches leicht wechselseitig in sein Ketoisomer Dihydroxyacetonphosphat und letztlich in Glycerol umgewandelt werden kann.

[0010] Genau gesagt synthetisieren die Bakterien *Bacillus licheniformis* und *Lactobacillus lycopersica* Glycerol, und Glycerolerzeugung wird in den halogentoleranten Algen *Dunaliella* sp. und *Asteromonas gracilis* zum Schutz gegen hohe externe Salzkonzentrationen gefunden. Ähnlich synthetisieren verschiedene osmotolerante Hefen Glycerol als Schutzmaßnahme. Die meisten Stämme von *Saccharomyces* erzeugen etwas Glycerol während der alkoholischen Gärung, und dies kann physiologisch durch die Anwendung von osmotischem Streß erhöht werden. Früher in diesem Jahrhundert wurde kommerzielle Glycerolherstellung durch die Verwendung von *Saccharomyces*-Kulturen erreicht, zu welchen „Steuerungsreagenzien“ wie beispielsweise Sulfate oder Alkalien hinzugegeben wurden. Durch die Bildung eines inaktiven Komplexes blockieren oder hemmen die Steuerungsmittel die Umwandlung von Acetaldehyd in Ethanol; so sind überschüssige reduzierende Äquivalente (NADH) verfügbar für oder werden in Richtung zu DHAP zur Reduktion „gesteuert“, wobei Glycerol erzeugt wird. Dieses Verfahren wird durch die teilweise Hemmung des Hefewachstums begrenzt, die auf die Sulfite zurückzuführen ist. Diese Begrenzung kann durch die Verwendung von Alkalien, die überschüssige NADH-Äquivalente durch einen andersartigen Mechanismus erzeugen, teilweise überwunden werden. In dieser praktischen Ausführung initiierten die Alkalien eine Canizzaro-Disproportionierung, wobei sich Ethanol und Essigsäure aus zwei Äquivalenten von Acetaldehyd ergeben.

[0011] Das Gen, codierend Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase (DAR1, GPD1), ist aus *S. diastaticus* kloniert und sequenziert worden (Wang et al., J. Bact. 176, 7091–7095 (1994)). Das DAR1-Gen wurde in einen Shuttle-Vektor kloniert und verwendet, um *E. coli* zu transformieren, wo Expression aktives Enzym erzeugte. Wang et al. (vorstehend) erkennen, daß DAR1 durch die zelluläre osmotische Umgebung reguliert wird, aber weisen nicht darauf hin, wie das Gen verwendet werden könnte, um die 1,3-Propandiol-Herstellung in einem rekombinanten Mikroorganismus zu erhöhen.

[0012] Andere Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase-Enzyme sind isoliert worden: zum Beispiel wurde

sn-Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase aus *Saccharomyces cerevisiae* kloniert und sequenziert (Larason et al., Mol. Microbiol. 10, 1101 (1993)), und Albertyn et al. (Mol. Cell. Biol. 14, 4135 (1994)) lehren das Klonieren von GPD1, codierend eine Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase aus *Saccharomyces cerevisiae*. Wie Wang et al. (vorstehend) erkennen sowohl Albertyn et al. als auch Larason et al. die osmotische Empfindlichkeit der Regulierung dieses Gens, aber weisen nicht darauf hin, wie das Gen bei der Herstellung von 1,3-Propandiol in einem rekombinanten Mikroorganismus verwendet werden könnte.

[0013] Wie bei G3PDH wurde Glycerol-3-Phosphatase aus *Saccharomyces cerevisiae* isoliert und das Protein als durch das GPP1- und GPP2-Gen codiert identifiziert (Norbeck et al., J. Biol. Chem. 271, 13875 (1996)). Wie die Gene, die G3PDH codieren, scheint es, daß GPP2 osmosempfindlich ist.

[0014] Obwohl die Umwandlung einer fermentierbarer Kohlenstoffquelle, die anders als Glycerol oder Dihydroxyaceton ist, durch einen einzigen Mikroorganismus in 1,3-Propandiol wünschenswert ist, wurde dokumentiert, daß es in einem derartigen Bemühen bedeutende Unterschiede zu überwinden gibt. Zum Beispiel lehren Gottschalk et al. (EP 373230), daß das Wachstum der meisten Stämme, verwendbar für die Herstellung von 1,3-Propandiol, einschließlich *Citrobacter freundii*, *Clostridium autobutylicum*, *Clostridium butylicum* und *Klebsiella pneumoniae*, durch die Anwesenheit eines Wasserstoffdonors wie beispielsweise Fructose oder Glucose gestört wird. Stämme von *Lactobacillus brevis* und *Lactobacillus buchneri*, welche 1,3-Propandiol in Cofermentationen von Glycerol und Fructose oder Glucose erzeugen, wachsen nicht, wenn Glycerol als die alleinige Kohlenstoffquelle bereitgestellt wird, und, obwohl gezeigt wurde, daß ruhende Zellen Glucose oder Fructose metabolisieren können, erzeugen sie kein 1,3-Propandiol (Veiga DA Cunha et al., J. Bacteriol., 174, 1013 (1992)). Ähnlich wurde gezeigt, daß ein Stamm von *Llyobacter polytropus*, welcher 1,3-Propandiol erzeugt, wenn Glycerol und Acetat bereitgestellt werden, kein 1,3-Propandiol aus Kohlenstoffsubstraten erzeugt, die andere sind als Glycerol, einschließlich Fructose und Glucose (Steib et al., Arch. Microbiol. 140, 139 (1984)). Schließlich lehrten Tong et al. (Appl. Biochem. Biotech. 34, 149 (1992)), daß rekombinante *Escherichia coli*, transformiert mit dem dha-Regulon, codierend Glycerol-Dehydratase, 1,3-Propandiol in Abwesenheit von exogenem Glycerol weder aus Glucose noch aus Xylose erzeugt.

[0015] Es wurde über Versuche, die Ausbeute von 1,3-Propandiol aus Glycerol zu verbessern, berichtet, wo Cosubstrate, die imstande sind, reduzierende Äquivalente, typischerweise fermentierbare Zucker, bereitzustellen, in das Verfahren eingeschlossen werden. Verbesserungen in der Ausbeute wurden für ruhende Zellen von *Citrobacter freundii* und *Klebsiella pneumoniae* DSM 4270, cofermentierend Glycerol und Glucose, beansprucht (Gottschalk et al., vorstehend; und Tran-Dinh et al., DE 3734764); aber nicht für wachsende Zellen von *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25955, cofermentierend Glycerol und Glucose, welche kein 1,3-Propandiol erzeugten (I-T. Tong, PH. D. Thesis, University of Wisconsin-Madison (1992)). Erhöhte Ausbeuten wurden für die Cofermentation von Glycerol und Glucose oder Fructose durch eine rekombinante *Escherichia coli* berichtet; jedoch wird in Abwesenheit von Glycerol kein 1,3-Propandiol erzeugt (Tong et al., vorstehend). In diesen Systemen verwenden einzelne Mikroorganismen das Kohlehydrat als Ausgangsstoff der Erzeugung von NADH, während Energie und Kohlenstoff zur Zellerhaltung oder zum Wachstum bereitgestellt wird. Diese Offenbarungen weisen darauf hin, daß Zucker nicht in den Kohlenstoffstrom eintreten, der 1,3-Propandiol erzeugt.

[0016] Kürzlich jedoch wurde die Umwandlung von Kohlenstoffsubstraten, die anders als Glycerol oder Dihydroxyaceton sind, in 1,3-Propandiol durch einen einzigen Mikroorganismus, der ein Dehydratase-Enzym exprimiert, beschrieben (US 5686276; WO 9821339; WO 9928480 und WO 9821341 (US 6013494)). Eine spezifische Unzulänglichkeit in den biologischen Verfahren, die zu der Herstellung von 1,3-Propandiol aus entweder Glycerol oder Glucose führen, war der niedrige Titer des Produkts, der über Fermentation erreicht wurde; so ist ein energieintensives Trennverfahren, um 1,3-Propandiol aus der wässrigen Fermentationsbrühe zu erhalten, erforderlich. Fed-Batch- oder Chargen-Fermentationen von Glycerol zu 1,3-Propandiol haben zu finalen Titern von 65 g/l durch *Clostridium butyricum* (Saint-Amans et al., Biotechnology Letters 16, 831 (1994)), 71 g/l durch *Clostridium-butyricum*-Mutanten (Abbad-Andaloussi et al., Appl. Environ. Microbiol. 61, 4413 (1995)), 61 g/l durch *Klebsiella pneumoniae* (Homann et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 33, 121 (1990)) und 35 g/l durch *Citrobacter freundii* (Homann et al., vorstehend) geführt. Fermentationen von Glucose zu 1,3-Propandiol, die den aus Glycerol-Fermentationen erhaltenen Titer überschreiten, sind noch nicht offenbart worden.

[0017] Das Problem, das zu lösen bleibt, ist, wie 1,3-Propandiol mit hohem Titer und durch einen einzigen Mikroorganismus aus einem preisgünstigen Kohlenstoffsubstrat, wie beispielsweise Glucose oder andere Zucker, biologisch herzustellen ist. Die biologische Herstellung von 1,3-Propandiol erfordert Glycerol als Substrat für eine zweistufige aufeinanderfolgende Reaktion, in der ein Dehydratase-Enzym (typischerweise eine Coenzym-B₁₂-abhängige Dehydratase) Glycerol in eine Zwischenverbindung, 3-Hydroxypropionaldehyd, umwan-

delt, welche dann durch eine NADH- (oder NADPH) abhängige Oxidoreduktase zu 1,3-Propandiol reduziert wird. Die Komplexität der Anforderungen an den Cofaktor erfordert die Verwendung eines Ganzzellenkatalysators für ein industrielles Verfahren, das diese Reaktionssequenz für die Herstellung von 1,3-Propandiol benutzt.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0018] Die Anmelder haben das festgestellte Problem gelöst, und die vorliegende Erfindung stellt biologische Umwandlung einer fermentierbaren Kohlenstoffquelle direkt in 1,3-Propandiol mit wesentlich höherem Titer als dem bisher erhaltenen und mit der Verwendung eines einzigen Mikroorganismus bereit. Glucose wird als Modells substrat verwendet und *E. coli* wird als Modellwirt verwendet. Rekombinante *E. coli*, exprimierend eine Gruppe von Genen (umfassend Gene, die eine Dehydratase-Aktivität, einen Dehydratase-Reaktivierungsfaktor, eine 1,3-Propandiol-Oxidoreduktase (*dhaT*), eine Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase und eine Glycerol-3-Phosphatase codieren) wandeln Glucose mit einem Titer, der sich dem von Glycerol für 1,3-Propandiol-Fermentationen nähert, in 1,3-Propandiol um.

[0019] In dieser Erfindung führt die Eliminierung des funktionellen *dhaT*-Gens in dieser rekombinanten *E. coli* zu einem wesentlich höheren Titer von 1,3-Propandiol aus Glucose. Diese unerwartete Zunahme im Titer führt zu verbesserter Ökonomie und so einem verbesserten Verfahren für die Herstellung von 1,3-Propandiol aus Glucose.

[0020] Weiterhin kann die vorliegende Erfindung im allgemeinen angewendet werden, um ein beliebiges Kohlenstoffsubstrat einzuschließen, das leicht in 1) Glycerol, 2) Dihydroxyaceton, 3) C₃-Verbindungen im Oxidationszustand von Glycerol (z.B. Glycerol-3-phosphat) oder 4) C₃-Verbindungen im Oxidationszustand von Dihydroxyaceton (z.B. Dihydroxyacetonphosphat oder Glycerinaldehyd-3-phosphat) umgewandelt wird. Die Herstellung von 1,3-Propandiol in dem *dhaT*-minus-Stamm erfordert eine nicht-spezifische katalytische Aktivität, die 3-HPA in 1,3-Propandiol umwandelt. Identifizierung des Enzyms (der Enzyme) und/oder des Gens (der Gene), verantwortlich für die nicht-spezifische katalytische Aktivität, die 3-HPA in 1,3-Propandiol umwandelt, führt zu der Herstellung von 1,3-Propandiol in einem weiten Bereich von Wirtsmikroorganismen mit Substraten aus einem weiten Bereich von kohlenstoffhaltigen Substraten. Es wird auch erwartet, daß die Verwendung dieser nicht-spezifischen katalytischen Aktivität, die 3-HPA in 1,3-Propandiol umwandelt, vermöge eines verbesserten Titers und der resultierenden verbesserten Ökonomie zu einem verbesserten Verfahren für die Herstellung von 1,3-Propandiol aus Glycerol oder Dihydroxyaceton führt.

[0021] Diese Aktivität wurde isoliert aus *E. coli* als Nucleinsäurefragment, codierend eine nicht-spezifische katalytische Aktivität für die Umwandlung von 3-Hydroxypropionaldehyd in 1,3-Propandiol, wie dargelegt in SEQ ID NO:58 oder wie ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus:

- (a) einem isolierten Nucleinsäurefragment, codierend alles oder einen wesentlichen Teil der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:57;
- (b) einem isolierten Nucleinsäurefragment, das einem isolierten Nucleinsäurefragment, codierend alles oder einen wesentlichen Teil der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:57, im wesentlichen ähnlich ist;
- (c) einem isolierten Nucleinsäurefragment, codierend ein Polypeptid aus mindestens 387 Aminosäuren mit mindestens 80% mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:57;
- (d) einem isolierten Nucleinsäurefragment, das mit (a) unter Hybridisierungsbedingungen von 0,1 × SSC, 0,1% SDS, 65°C und gewaschen mit 2 × SSC, 0,1% SDS und nachfolgend 0,1 × SSC, 0,1% SDS hybridisiert; und
- (e) einem isolierten Nucleinsäurefragment, das komplementär zu (a), (b), (c) oder (d) ist. Alternativ ist die nichtspezifische katalytische Aktivität in dem Polypeptid, wie dargelegt in SEQ ID NO:57, verkörpert.

[0022] Ein chimäres Gen kann konstruiert werden, umfassend das vorstehend beschriebene isolierte Nucleinsäurefragment, operabel mit geeigneten regulatorischen Sequenzen verknüpft. Dieses chimäre Gen kann verwendet werden, um Mikroorganismen, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Aerobacter*, *Lactobacillus*, *Aspergillus*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Mucor*, *Torulopsis*, *Methylobacter*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Aerobacter*, *Streptomyces*, *Escherichia* und *Pseudomonas*, zu transformieren. *E. coli* ist der bevorzugte Wirt.

[0023] Dementsprechend stellt die vorliegende Erfindung einen rekombinanten Mikroorganismus, verwendbar für die Herstellung von 1,3-Propandiol, bereit, umfassend: (a) mindestens ein Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität; (b) mindestens ein Gen, codierend ein Polypeptid mit

Glycerol-3-Phosphatase-Aktivität; (c) mindestens ein Gen, codierend ein Polypeptid mit einer Dehydratase-Aktivität; (d) mindestens ein Gen, codierend einen Dehydratase-Reaktivierungsfaktor; (e) mindestens ein endogenes Gen, codierend eine nichtspezifische katalytische Aktivität, ausreichend, um 3-Hydroxypropionaldehyd in 1,3-Propandiol umzuwandeln, wobei kein funktionelles dhaT-Gen, codierend eine 1,3-Propandiol-Oxidoreductase, vorhanden ist. Gegebenenfalls kann der rekombinante Mikroorganismus Mutationen (z.B. Deletionsmutationen oder Punktmutationen) in endogenen Genen, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus: (a) einem Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-Kinase-Aktivität; (b) einem Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-Dehydrogenase-Aktivität; und (c) einem Gen, codierend ein Polypeptid mit Triosephosphat-Isomerase-Aktivität, umfassen.

[0024] In einer anderen Ausführungsform schließt die Erfindung ein Verfahren für die Herstellung von 1,3-Propandiol ein, umfassend: (a) Inkontaktbringen unter geeigneten Bedingungen einer rekombinanten E. coli, die ein dha-Regulon umfaßt und der ein funktionelles dhaT-Gen, codierend eine 1,3-Propandiol-Oxidoreductase-Aktivität, fehlt, mit mindestens einer Kohlenstoffquelle, wobei die Kohlenstoffquelle aus der Gruppe, bestehend aus Monosacchariden, Oligosacchariden, Polysacchariden und ein-Kohlenstoff-Substraten, ausgewählt ist; und (b) gegebenenfalls Gewinnen des 1,3-Propandiols, hergestellt in (a).

[0025] Die Erfindung stellt auch ein Verfahren für die Herstellung von 1,3-Propandiol von einem rekombinanten Mikroorganismus bereit, umfassend: (a) Inkontaktbringen des rekombinanten Mikroorganismus der vorliegenden Erfindung mit mindestens einer Kohlenstoffquelle, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Monosacchariden, Oligosacchariden, Polysacchariden und ein-Kohlenstoff-Substraten, wodurch 1,3-Propandiol erzeugt wird; und (b) gegebenenfalls Gewinnen des 1,3-Propandiols, erzeugt in (a).

[0026] Ähnlich beabsichtigt die Erfindung, ein Verfahren für die Herstellung von 1,3-Propandiol von einem rekombinanten Mikroorganismus bereitzustellen, umfassend:

(a) Inkontaktbringen eines rekombinanten Mikroorganismus mit mindestens einer Kohlenstoffquelle, wobei der rekombinante Mikroorganismus umfaßt:

(i) mindestens ein Gen, codierend ein Polypeptid mit einer Dehydratase-Aktivität;

(ii) mindestens ein Gen, codierend einen Dehydratase-Reaktivierungsfaktor;

(iii) mindestens ein endogenes Gen, codierend eine nichtspezifische katalytische Aktivität, ausreichend, 3-Hydroxypropionaldehyd in 1,3-Propandiol umzuwandeln, wobei kein funktionelles dhaT-Gen, codierend eine 1,3-Propandiol-Oxidoreductase, vorhanden ist;

wobei die Kohlenstoffquelle aus der Gruppe, bestehend aus Glycerol und Dihydroxyaceton, ausgewählt ist, wobei 1,3-Propandiol erzeugt wird, und

(b) gegebenenfalls Gewinnen des 1,3-Propandiols, erzeugt in (a).

[0027] Noch ein anderer Aspekt der Erfindung stellt die gemeinsame Zuführung des Kohlenstoffsubstrats bereit. In dieser Ausführungsform für die Herstellung von 1,3-Propandiol sind die Schritte: (a) Inkontaktbringen einer rekombinanten E. coli mit einer ersten Kohlenstoffquelle und mit einer zweiten Kohlenstoffquelle, wobei die rekombinante E. coli umfaßt: (i) mindestens ein exogenes Gen, codierend ein Polypeptid mit einer Dehydratase-Aktivität; (ii) mindestens ein exogenes Gen, codierend einen Dehydratase-Aktivierungsfaktor, (iii) mindestens ein exogenes Gen, codierend eine nichtspezifische katalytische Aktivität, ausreichend, um 3-Hydroxypropionaldehyd in 1,3-Propandiol umzuwandeln, wobei kein funktionelles dhaT-Gen, codierend eine 1,3-Propandiol-Oxidoreductase-Aktivität, in der rekombinanten E. coli vorhanden ist und wobei die erste Kohlenstoffquelle aus der Gruppe, bestehend aus Glycerol und Dihydroxyaceton, ausgewählt ist und die zweite Kohlenstoffquelle aus der Gruppe, bestehend aus Monosacchariden, Oligosacchariden, Polysacchariden und ein-Kohlenstoff-Substraten, ausgewählt ist, und (b) das 1,3-Propandiol, erzeugt in (a), wird gegebenenfalls gewonnen. Die gemeinsame Zuführung kann aufeinanderfolgend oder gleichzeitig sein. Die rekombinante E. coli, verwendet in einer Ausführungsform mit gemeinsamer Zuführung, kann weiterhin umfassen: (a) eine Gruppe von exogenen Genen, bestehend aus (i) mindestens einem Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität; (ii) mindestens einem Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-3-Phosphatase-Aktivität; und (iii) mindestens einer Untergruppe von Genen, codierend die Genprodukte von dhaR, orfY, orfX, orfW, dhaB1, dhaB2, dhaB3 und orfZ, und (b) eine Gruppe von endogenen Genen, wobei jedes Gen eine das Gen inaktivierende Mutation aufweist; wobei die Gruppe aus: (i) einem Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-Kinase-Aktivität; (ii) einem Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-Dehydrogenase-Aktivität; und (iii) einem Gen, codierend ein Polypeptid mit Triosephosphat-Isomerase-Aktivität, besteht.

[0028] Zu verwendbaren rekombinanten E.-coli-Stämmen gehören der rekombinante E.-coli-Stamm, umfassend: (a) eine Gruppe von zwei endogenen Genen, wobei jedes Gen eine das Gen inaktivierende Mutation aufweist, wobei die Gruppe aus: (i) einem Gen, codierend ein Polypeptid mit einer Glycerol-Kinase-Aktivität;

und (ii) einem Gen, codierend ein Polypeptid mit einer Glycerol-Dehydrogenase-Aktivität, besteht; (b) mindestens ein exogenes Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität; (c) mindestens ein exogenes Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-3-Phosphatase-Aktivität; und (d) einen Vektor pKP32, umfassend dhaR, orfY, orfX, orfW, dhaB1, dhaB2, dhaB3 und orfZ, wie angegeben in SEQ ID NO: 1.

[0029] Zu anderen verwendbaren Ausführungsformen gehören rekombinante E. coli, umfassend: (a) eine Gruppe von exogenen Genen, bestehend aus: (i) mindestens einem Gen, codierend ein Polypeptid mit einer Dehydratase-Aktivität; (ii) mindestens einem Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität; (iii) mindestens einem Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-3-Phosphatase-Aktivität; und (iv) mindestens einem Gen, codierend einen Dehydratase-Reaktivierungsfaktor; und (b) mindestens ein endogenes Gen, codierend eine nicht-spezifische katalytische Aktivität, 3-Hydroxypropionaldehyd in 1,3-Propandiol umzuwandeln; wobei kein funktionelles dhaT-Gen, codierend eine 1,3-Propandiol-Oxidoreductase-Aktivität, in der rekombinanten E. coli vorhanden ist.

[0030] Eine andere Ausführungsform ist eine rekombinante E. coli, umfassend: (a) eine Gruppe von exogenen Genen, bestehend aus: (i) mindestens einem Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität; (ii) mindestens einem Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-3-Phosphatase-Aktivität; und (iii) mindestens einer Untergruppe von Genen, codierend die Genprodukte von dhaR, orfY, orfX, orfW, dhaB1, dhaB2, dhaB3 und orfZ, und (b) mindestens ein endogenes Gen, codierend eine nicht-spezifische katalytische Aktivität, 3-Hydroxypropionaldehyd in 1,3-Propandiol umzuwandeln; wobei kein funktionelles dhaT-Gen, codierend eine 1,3-Propandiol-Oxidoreductase-Aktivität, in der rekombinanten E. coli vorhanden ist. Diese Ausführungsform schließt auch ein Verfahren unter Verwendung einer rekombinanten E. coli ein, weiterhin umfassend eine Gruppe von endogenen Genen, wobei jedes Gen eine das Gen inaktivierende Mutation aufweist, wobei die Gruppe aus: (a) einem Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-Kinase-Aktivität; (b) einem Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-Dehydrogenase-Aktivität; und (c) einem Gen, codierend ein Polypeptid mit Triosephosphat-Isomerase-Aktivität, besteht.

[0031] Diese Ausführungsform schließt noch weiter ein Verfahren für die Bioproduktion von 1,3-Propandiol ein, umfassend: (a) Inkontaktbringen der unmittelbar offenbarten rekombinanten E. coli unter geeigneten Bedingungen mit mindestens einer Kohlenstoffquelle, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Monosacchariden, Oligosacchariden, Polysacchariden und ein-Kohlenstoff-Substraten, wodurch 1,3-Propandiol erzeugt wird; und (b) gegebenenfalls Gewinnen des 1,3-Propandiols, erzeugt in (a).

[0032] Und schließt auch ein weiteres Verfahren für die Bioproduktion von 1,3-Propandiol ein, umfassend: (a) Inkontaktbringen der rekombinanten E. coli der unmittelbar offenbarten Ausführungsformen, die weiterhin umfassen: (i) mindestens ein exogenes Gen, codierend ein Polypeptid mit einer Dehydratase-Aktivität; (ii) mindestens ein exogenes Gen, codierend einen Dehydratase-Reaktivierungsfaktor; (iii) mindestens ein endogenes Gen, codierend eine nicht-spezifische katalytische Aktivität, 3-Hydroxypropionaldehyd in 1,3-Propandiol umzuwandeln, wobei die mindestens eine Kohlenstoffquelle aus der Gruppe, bestehend aus Glycerol und Dihydroxyaceton, ausgewählt ist, und (b) gegebenenfalls Gewinnen des 1,3-Propandiols, erzeugt in (a).

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN, SEQUENZBESCHREIBUNGEN UND BIOLOGISCHEN HINTERLEGUNGEN

[0033] Die Erfindung kann vollständiger aus der folgenden ausführlichen Beschreibung, den Figuren, den begleitenden Sequenzbeschreibungen und biologischen Hinterlegungen verstanden werden, die Teile dieser Anmeldung bilden.

[0034] [Fig. 1](#) stellt die Genorganisation innerhalb der Sequenz des dha-Regulon-Subklons pHK28-26 dar.

[0035] [Fig. 2](#) stellt eine graphische Darstellung des extrazellulären löslichen Proteins (g/l) dar, verglichen zwischen zwei Fermentationsdurchläufen im wesentlichen wie in Beispiel 7 beschrieben unter Verwendung einer konstanten Zufuhr von Vitamin B₁₂. In einem Fall, ausgezogene Linien, war der verwendete Stamm KLP23/pAH48/pKP32. In dem anderen Fall, gestrichelte Linien, war der verwendete Stamm KLP23/pAH48/pDT29.

[0036] [Fig. 3](#) stellt eine graphische Darstellung der Zell-Lebensfähigkeit [(lebensfähige Zellen/ml)/OD550] dar, verglichen zwischen zwei Fermentationsdurchläufen im wesentlichen wie in Beispiel 7 beschrieben unter Verwendung einer konstanten Zufuhr von Vitamin B₁₂. In einem Fall (ausgezogene Linien) war der verwendete Stamm KLP23/pAH48/pKP32. In dem anderen Fall (gestrichelte Linien) war der verwendete Stamm

KLP23/pAH48/pDT29.

[0037] **Fig. 4** stellt eine graphische Darstellung der Ausbeute von Glycerol aus Glucose dar, verglichen zwischen zwei Fermentationsdurchläufen im wesentlichen wie in Beispiel 7 beschrieben, aber in Abwesenheit von Vitamin B₁₂ oder Coenzym B₁₂. In einem Fall (ausgezogene Linien) war der verwendete Stamm KLP23/pAH48/pKP32. In dem anderen Fall (gestrichelte Linien) war der verwendete Stamm KLP23/pAH48/pDT29.

[0038] **Fig. 5** ist ein Fließdiagramm, das die metabolische Umwandlung von Glucose in 1,3-Propandiol veranschaulicht.

[0039] **Fig. 6** ist ein 2D-PAGE-Membran-Blot mit der löslichen Proteinfraction, extrahiert aus einer Bande, die Oxidoreductase-Aktivität (nicht-spezifische katalytische Aktivität) von endogener *E. coli* auf einem nativen Gel zeigt.

[0040] Die 68 Sequenzbeschreibungen und die Sequenzaufzählung, die hier angefügt sind, erfüllen die Regeln, die Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzoffenbarungen in Patentanmeldungen bestimmen, wie sie in 37 C.F.R. §1.821–1.825 („Requirements for Patent Applications Containing Nucleotide Sequences and/or Amino Acid Sequence Disclosures – the Sequence Rules“ („Anforderungen für Patentanmeldungen, die Nucleotidsequenzen und/oder Aminosäuresequenzoffenbarungen enthalten – die Sequenzregeln“)) angegeben sind, und stimmen mit dem Standard ST2.5 (1998) der World Intellectual Property Organization (WIPO) und den Anforderungen für die Sequenzaufzählung der EPO und PCT (Regeln 5.2 und 49.5(a-bis) und Abschnitt 208 und Anhang C der Verwaltungsanweisungen überein. Die Sequenzbeschreibungen enthalten den ein-Buchstaben-Code für Nucleotidsequenzzeichen und die drei-Buchstaben-Codes für Aminosäuren, wie sie in Übereinstimmung mit den IUPAC-IYUB-Standards, beschrieben in Nucleic Acids Res. 13, 3021–3030 (1985) und in dem Biochemical Journal 219, 345–373 (1984) definiert sind.

[0041] SEQ ID NO:1 enthält die Nucleotidsequenz, bestimmt aus einem 12,1-kb-EcoRI-Sall-Fragment aus pKP1 (Cosmid, enthaltend DNA aus *Klebsiella pneumoniae*), subkloniert in pBI31 (IBI Biosystem, New Haven, CT), und bezeichnet als pHK28-26. Tabelle 1 stellt weiter ausführlich Gene dar, entsprechend Basenpaaren, identifiziert innerhalb SEQ ID NO:1, und assoziierte Funktionalität. Siehe auch Beispiel 1.

[0042] SEQ ID NO:57 enthält die Nucleotidsequenz, bestimmt für yqhD.

[0043] Die Anmelder haben die folgenden biologischen Hinterlegungen unter den Bedingungen des Budapestervertrages zu der Internationalen Erkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für die Zwecke des Patentverfahrens gemacht:

[0044] SEQ ID NO:58 enthält die Aminosäuresequenz, bestimmt für YahD.

Identifizierungsreferenz des Hinterlegers	Internationale Bezeichnung des Hinterlegungsdepots	Datum der Hinterlegung
Transformierte <i>E. coli</i> DH5 α , enthaltend einen Teil des <i>Klebsiella</i> -Genoms, codierend das Glycerol-Dehydratase-Enzym	ATCC 69789	18. April 1995
Transformierte <i>E. coli</i> DH5 α , enthaltend cosmit pKP4, enthaltend einen Teil von <i>Klebsiella</i> -Genom, codierend ein Diol-Dehydratase-Enzym	ATCC 69790	18. April 1995
<i>E. coli</i> MSP33.6	ATCC 98598	25. November 1997
<i>glpK</i> -Mutante <i>E. coli</i> RJF10m	ATCC 98597	25. November 1997

[0045] Die Hinterlegung(en) wird (werden) in dem angezeigten internationalen Hinterlegungsdepot für min-

destens 30 Jahre gehalten und werden bei Erteilung eines Patents, das sie offenbart, für die Öffentlichkeit verfügbar gemacht. Die Verfügbarkeit einer Hinterlegung bildet keine Lizenz zur praktischen Ausführung der vorliegenden Erfindung in Schmälerung von Patentrechten, die durch die Aktion der Regierung erteilt werden.

[0046] Wie hier verwendet bezeichnet „ATCC“ das internationale Hinterlegungsdepot American Type Culture Collection, befindlich 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110–2209 USA. Die „ATCC-Nr.“ ist die Zugangs-Nr. zu Kulturen bei Hinterlegung bei der ATCC.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0047] Die vorliegende Erfindung stellt ein verbessertes Verfahren zur biologischen Umwandlung einer fermentierbaren Kohlenstoffquelle direkt in 1,3-Propandiol unter Verwendung eines einzigen Mikroorganismus bereit. Das Verfahren ist durch verbesserten Titer, Ausbeute und Zell-Lebensfähigkeit ebenso wie eine Abnahme der Zell-Lyse während der Fermentation gekennzeichnet.

[0048] Die vorliegende Erfindung basiert teilweise auf der Beobachtung, daß Verfahren der Fermentation von 1,3-Propandiol, die 1,3-Propandiol-Oxidoreductase (dhaT) umfassen, durch hohe Niveaus von 3HPA und anderen Aldehyden und Ketonen in dem Medium gekennzeichnet sind, was mit einer Abnahme der Zell-Lebensfähigkeit in Wechselbeziehung gebracht wird. Die vorliegende Erfindung basiert auch teilweise auf der unerwarteten Erkenntnis, daß der Modellwirt, *E. coli*, durch eine endogene nicht-spezifische katalytische Aktivität, die imstande ist, 3-Hydroxypropionaldehyd in 1,3-Propandiol umzuwandeln, imstande ist, 3-HPA in 1,3-Propandiol umzuwandeln. Die vorliegende Erfindung basiert weiter teilweise auf der unerwarteten Erkenntnis, daß ein *E.-coli*-Fermentationsverfahren, das diese nicht-spezifische katalytische Aktivität umfaßt und dem eine funktionelle dhaT fehlt, zu erhöhter Zell-Lebensfähigkeit während der Fermentation führt und höhere Titer und/oder Ausbeuten von 1,3-Propandiol bereitstellt als ein Fermentationsverfahren, das eine funktionelle dhaT umfaßt.

[0049] In einem Aspekt ist Glycerol ein Modellsubstrat, der Wirtsmikroorganismus weist eine Mutation in der Wildtyp-dhaT auf, derart, daß es keine 1,3-Propandiol-Oxidoreductase-Aktivität gibt, und umfaßt eine nicht-spezifische katalytische Aktivität, die ausreichend ist, um 3-Hydroxypropionaldehyd in 1,3-Propandiol umzuwandeln. In einem anderen Aspekt ist Glucose ein Modellsubstrat, und rekombinante *E. coli* ist ein Modellwirt. In diesem Aspekt umfaßt *E. coli* eine endogene nicht-spezifische katalytische Aktivität, die ausreichend ist, um 3-Hydroxypropionaldehyd in 1,3-Propandiol umzuwandeln. In einer Ausführungsform ist die nicht-spezifische katalytische Aktivität eine Alkohol-Dehydrogenase.

[0050] In einem Aspekt stellt die vorliegende Erfindung eine rekombinante *E. coli* bereit, exprimierend eine Gruppe von Genen, umfassend (a) mindestens ein Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität; (b) mindestens ein Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-3-Phosphatase-Aktivität, (c) mindestens ein Gen, codierend ein Polypeptid mit einer Dehydratase-Aktivität; (d) mindestens ein Gen, codierend einen Dehydratase-Reaktivierungsfaktor; und (e) mindestens ein endogenes Gen, codierend eine nicht-spezifische katalytische Aktivität, die ausreichend ist, um 3-Hydroxypropionaldehyd in 1,3-Propandiol umzuwandeln, wobei das mindestens eine endogene Gen eine Nucleinsäure umfaßt, codierend ein Polypeptid aus mindestens 387 Aminosäuren mit mindestens 80% Homologie mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:57, wobei kein funktionelles dhaT-Gen, codierend eine 1,3-Propandiol-Oxidoreductase-Aktivität, in der rekombinanten *E. coli* vorhanden ist. Die Eliminierung des funktionellen dhaT-Gens in dieser rekombinanten *E. coli* stellt einen unerwartet höheren Titer von 1,3-Propandiol aus Glucose bereit, als er bisher erlangt wurde.

[0051] In einem anderen Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein verbessertes Verfahren für die Herstellung von 1,3-Propandiol aus Glucose erreicht, in dem eine rekombinante *E. coli*, enthaltend Gene, codierend eine G3PDH, eine G3P-Phosphatase, eine Dehydratase und einen Dehydratase-Reaktivierungsfaktor, verwendet wird, verglichen mit einem Verfahren, in dem eine rekombinante *E. coli*, enthaltend Gene, codierend eine G3PDH, eine G3P-Phosphatase, eine Dehydratase, einen Dehydratase-Reaktivierungsfaktor und außerdem eine funktionelle dhaT, verwendet wird. Das dramatisch verbesserte Verfahren stützt sich auf ein endogenes Gen, codierend eine nicht-spezifische katalytische Aktivität, von der zu erwarten ist, eine Alkohol-Dehydrogenase zu sein, welche in *E. coli* vorhanden ist.

[0052] Die dramatische Verbesserung in dem Verfahren ist als eine Zunahme im 1,3-Propandiol-Titer offensichtlich, wie in den Beispielen 7 und 9 veranschaulicht wird. Die Verbesserung in dem Verfahren ist ebenfalls als eine Abnahme in der Zell-Lyse offensichtlich, wie sie durch die Konzentration von extrazellulärem löslichen Protein in der Fermentationsbrühe bestimmt wird. Dieser Aspekt der Erfindung wird in [Fig. 2](#) veranschaulicht.

Zusätzlich ist die Verbesserung in dem Verfahren als verlängerte Zell-Lebensfähigkeit über den Verlauf der Fermentation offensichtlich. Dieser Aspekt der Erfindung wird in [Fig. 3](#) veranschaulicht. Weiterhin ist die Verbesserung in dem Verfahren auch als eine Zunahme der Ausbeute offensichtlich. In *E. coli*, exprimierend eine 1,3-Propandiol-Oxidoreductase (dhaT) (zum Beispiel *E. coli* KLP23, transformiert mit dem Plasmid pDT29), kann Glycerol zu einem Produkt anders als 3-HPA metabolisiert werden. In direktem Gegensatz wird in *E. coli*, nicht eine 1,3-Propandiol-Oxidoreductase (dhaT) exprimierend (zum Beispiel *E. coli* KLP23, transformiert mit dem Plasmid pKP32), Glycerol nicht zu einem Produkt anders als 3-HPA metabolisiert. Daß dieser kryptische Weg der Anwesenheit oder Abwesenheit einer funktionellen dhaT zuzuschreiben ist, wird durch die niedrigere Ausbeute von Glycerol aus Glucose demonstriert, wie sie in [Fig. 4](#) veranschaulicht wird.

[0053] Wie hier verwendet können die folgenden Begriffe für die Interpretation der Ansprüche und der Beschreibung verwendet werden.

[0054] Die Begriffe „Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase“ und „G3PDH“ bezeichnen ein Polypeptid, verantwortlich für eine Enzymaktivität, die die Umwandlung von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) in Glycerol-3-phosphat (G3P) katalysiert. In vivo kann G3PDH NADH-; NADPH-; oder FAD-abhängig sein. Wenn speziell eine Cofaktor-spezifische Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase bezeichnet wird, werden die Begriffe „NADH-abhängige Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase“, „NADPH-abhängige Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase“ und „FAD-abhängige Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase“ verwendet. Wie es allgemein der Fall ist, daß NADH-abhängige und NADPH-abhängige Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase imstande sind, NADH und NADPH austauschbar zu verwenden (zum Beispiel durch das durch *gpsA* codierte Gen), werden die Begriffe NADH-abhängige und NADPH-abhängige Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase austauschbar verwendet. Das NADH-abhängige Enzym (EC 1.1.1.8) wird zum Beispiel durch verschiedene Gene einschließlich GPD1 (GenBank Z74071x2) oder GPD2 (GenBank Z35169x1) oder GPD3 (GenBank G984182) oder DAR1 (GenBank Z74071x2) codiert. Das NADPH-abhängige Enzym (EC 1.1.1.94) wird durch *gpsA* (GenBank U321643, (cds 197911–196892) G466746 und L45246) codiert. Das FAD-abhängige Enzym (EC 1.1.99.5) wird durch GUT2 (GenBank Z47047x23) oder *glpD* (GenBank 147838) oder *glpABC* (GenBank M20938) codiert (siehe WO 9928480 und Referenzen darin).

[0055] Die Begriffe „Glycerol-3-Phosphatase“, „sn-Glycerol-3-Phosphatase“ oder „d,l-Glycerol-Phosphatase“ und „G3P-Phosphatase“ bezeichnen ein Polypeptid, verantwortlich für eine Enzymaktivität, die die Umwandlung von Glycerol-3-phosphat und Wasser in Glycerol und anorganisches Phosphat katalysiert. G3P-Phosphatase wird zum Beispiel durch GPP1 (GenBank Z47047x125) oder GPP2 (GenBank U18813x11) codiert (siehe WO 9928480 und Referenzen darin).

[0056] Der Begriff „Glycerol-Kinase“ bezeichnet ein Polypeptid, verantwortlich für eine Enzymaktivität, die die Umwandlung von Glycerol und ATP zu Glycerol-3-phosphat und ADP katalysiert. Der energiereiche Phosphat-Donor ATP kann durch physiologische Austauschstoffe (z.B. Phosphoenolpyruvat) ersetzt werden. Glycerol-Kinase wird zum Beispiel durch GUT1 (GenBank U11583x19) und *glpK* (GenBank L19201) codiert (siehe WO 9928480 und Referenzen darin).

[0057] Der Begriff „Glycerol-Dehydrogenase“ bezeichnet ein Polypeptid, verantwortlich für eine Enzymaktivität, die die Umwandlung von Glycerol in Dihydroxyaceton (E.C. 1.1.1.6) oder Glycerol in Glyceraldehyd (E.C. 1.1.1.72) katalysiert. Ein Polypeptid, verantwortlich für eine Enzymaktivität, die die Umwandlung von Glycerol in Dihydroxyaceton katalysiert, wird auch als „Dihydroxyaceton-Reductase“ bezeichnet. Glycerol-Dehydrogenase kann von NADH (E.C. 1.1.1.6), NADPH (E.C. 1.1.1.72) oder anderen Cofaktoren (z.B. E.C. 1.1.99.22) abhängig sein. Eine NADH-abhängige Glycerol-Dehydrogenase wird zum Beispiel durch *glpA* (GenBank U00006) codiert (siehe WO 9928480 und Referenzen darin).

[0058] Der Begriff „Dehydratase-Enzym“ oder „Dehydratase“ bezeichnet eine Enzymaktivität, die die Umwandlung eines Glycerolmoleküls in das Produkt 3-Hydroxypropionaldehyd katalysiert. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung schließen die Dehydratase-Enzyme eine Glycerol-Dehydratase (E.C. 4.2.1.30) und eine Diol-Dehydratase (E.C. 4.2.1.28) mit bevorzugten Substraten von Glycerol bzw. 1,2-Propandiol ein. Gene für Dehydratase-Enzyme sind in *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium pasteurianum*, *Salmonella typhimurium* und *Klebsiella oxytoca* identifiziert worden. In jedem Fall ist die Dehydratase aus drei Untereinheiten zusammengesetzt: der großen oder „ α “-Untereinheit, der mittleren oder β -Untereinheit und der kleinen oder „ γ “-Untereinheit. Aufgrund der breiten Variation in der Gen-Nomenklatur, die in der Literatur verwendet wird, wird in Tabelle 1 eine vergleichende Übersicht angegeben, um die Identifizierung zu erleichtern. Die Gene werden auch in zum Beispiel Daniel et al. (FEMS Microbiol. Rev. 22, 553 (1999)) und Toraya und Mori (J. Biol. Chem. 274, 3372 (1999)) beschrieben. Bezugnehmend auf Tabelle 1 gehören zu Genen, codie-

rend die große oder „ α “-Untereinheit von Glycerol-Dehydratase, dhaB1, gldA und dhaB; gehören zu Genen, codierend die mittlere oder β -Untereinheit, dhaB2, gldB und dhaC; gehören zu Genen, codierend die kleine oder „ γ “-Untereinheit dhaB3, gldC und dhaE. Ebenfalls beziehungsweise auf Tabelle 1 gehören zu Genen, codierend die große oder „ α “-Untereinheit von Diol-Dehydratase pduC und pddA; gehören zu Genen, codierend die mittlere oder β -Untereinheit, pduD und pddB; gehören zu Genen, codierend die kleine oder „ γ “-Untereinheit pduE und pddC.

TABELLE 1: VERGLEICHENDE ÜBERSICHT VON GEN-NAMEN UND GENBANK-REFERENZEN FÜR DEHYDRATASE UND DEHYDRATASE-VERKNÜPFTEN FUNKTIONEN
GENFUNKTION:

Organismus (GenBank-Referenz)	regulatorisch		unbekannt		Reaktivierung		1,3-PD-Dehydrogenase		unbekannt	
	Gen	Basen-paare	Gen	Basen-paare	Gen	Basen-paare	Gen	Basen-paare	Gen	Basen-paare
K. pneumoniae (SEQ ID NO:1)	dhaR	2209-4134	orfW	4112-4642	orfX	4643-4996	dhaT	5017-6108	orfY	6202-6630
K. pneumoniae (U30903)			Orf2c	7116-7646	Orf2b	6762-7115	dhaT	5578-6741	Orf2a	5125-5556
K. pneumoniae (U60992)			gdrB							
C. freundii (U09771)	dhaR	3746-5671	orfW	5649-6179	orfX	6180-6533	dhaT	6550-7713	orfY	7736-8164
C. Pasteurianum (AF051373)										
C. Pasteurianum (AF006034)			orfW	210-731	orfX	1-196	dhaT	1232-2389	orfY	746-1177
S. typhimurium (AF026270)					pduH	8274-8645				
K. oxytoca (AF017781)					ddrB	2063-2440				
K. oxytoca (AF051373)										

GENFUNKTION :

	Dehydratase, α		Dehydratase, β		Dehydratase, γ		Reaktivierung	
	Gen	Basen-paare	Gen	Basen-paare	Gen	Basen-paare	Gen	Basen-paare
Organismus (GenBank-Referenz)								
K. pneumoniae (SEQ ID NO:1)	ddhaR	7044-8711	DhaB2	8724-9308	DhaB3	9311-9736	orfZ	9749-11572
K. pneumoniae (U30903)	DhaB1	3047-4714	DhaB2	2450-2890	DhaB3	2022-2447	DhaB4	186-2009
K. pneumoniae (U60992)	gldA	121-1788	gldB	1801-2385	gldC	2388-2813	gdrA	
C. freundii (U09771)	dhaB	8556-10223	dhaC	1779-2318	dhaE	10822-11250	orfZ	11260-13072
C. pasteurianum (AF051373)	dhaB	84-1748	dhaC	1779-2318	dhaE	2333-2773	orfZ	2790-4598
C. pasteurianum (AF006034)								
S. typhimurium (AF026270)	pduC	3557-5221	pduD	5232-5906	pduE	5921-6442	pduG	6452-8284
K. oxytoca (AF017781)								
K. oxytoca (AF51373)	pddA	121-1785	pddB	1796-2470	pddC	2485-3006		

[0059] Glycerol- und Diol-Dehydratasen sind Gegenstand für Mechanismus-basierte Suicid-Inaktivierung durch Glycerol und einige andere Substrate (Daniel et al., FEMS Microbiol. Rev. 22, 553 (1999)). Der Begriff

„Dehydratase-Reaktivierungsfaktor“ bezeichnet diejenigen Proteine, die verantwortlich für Reaktivierung der Dehydratase-Aktivität sind. Die Begriffe „Dehydratase-Reaktivierungsaktivität“, „Reaktivierung der Dehydratase-Aktivität“ oder „Regenerierung der Dehydratase-Aktivität“ bezeichnen das Phänomen der Umwandlung einer Dehydratase, die nicht zur Katalyse eines Substrats imstande ist, zu einer, die zur Katalyse eines Substrats imstande ist, oder das Phänomen der Hemmung der Inaktivierung einer Dehydratase oder das Phänomen der Erweiterung der nutzbaren Halbwertszeit des Dehydratase-Enzyms *in vivo*. Zwei Proteine sind identifiziert worden, als Dehydratase-Reaktivierungsfaktor beteiligt zu sein (siehe WO 9821341 (US 6013494) und Referenzen darin; Daniel et al., vorstehend; Toraya und Mori, *J. Biol. Chem.* 274, 3372 (1999); und Tobimatsu et al., *J. Bacteriol.* 181, 4110 (1999)). Bezugnehmend auf Tabelle 1 gehören zu Genen, codierend eines von den Proteinen, *orfZ*, *dhaB4*, *gdrA*, *pduG* und *ddrA*. Ebenfalls bezugnehmend auf Tabelle 1 gehören zu Genen, codierend das zweite von den zwei Proteinen, *orfX*, *orf2b*, *gdrB*, *pduH* und *ddrB*.

[0060] Die Begriffe „1,3-Propandiol-Oxidoreductase“, „1,3-Propandiol-Dehydrogenase“ oder „DhaT“ bezeichnen das (die) Polypeptid(e), verantwortlich für eine Enzymaktivität, die imstande ist, die gegenseitige Umwandlung von 3-HPA und 1,3-Propandiol zu katalysieren, mit der Maßgabe, daß gefunden wird, daß das (die) Gen(e), codierend derartige Aktivität, physikalisch oder transkriptionell mit einem Dehydratase-Enzym in seiner natürlichen (d.h. Wildtyp-)Gruppierung verknüpft ist (sind); zum Beispiel wird das Gen innerhalb eines *dha*-Regulons gefunden, wie es bei *dhaT* aus *Klebsiella pneumonia* der Fall ist. Bezugnehmend auf Tabelle 1 gehört zu Genen, codierend eine 1,3-Propandiol-Oxidoreductase, *dhaT* aus *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* und *Clostridium pasteurianum*. Jedes von diesen Genen codiert ein Polypeptid, gehörend zu der Familie von Typ-III-Alkohol-Dehydrogenasen, zeigt ein konserviertes Eisenbindungsmotiv und hat eine Präferenz für die NAD^+/NADH -verknüpfte gegenseitige Umwandlung von 3-HPA und 1,3-Propandiol (Johnson und Lin, *J. Bacteriol.* 169, 2050 (1987); Daniel et al., *J. Bacteriol.* 177, 2151 (1995); und Leurs et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 154, 337 (1997)). Enzyme mit ähnlichen physikalischen Eigenschaften sind aus *Lactobacillus brevis* und *Lactobacillus buchneri* isoliert worden (Veiga da Dunha und Foster, *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2005 (1992)).

[0061] Der Begriff „*dha*-Regulon“ bezeichnet eine Gruppe von assoziierten Genen oder offenen Leserahmen, codierend verschiedenartige biologische Aktivitäten, einschließlich, ohne aber darauf begrenzt zu sein, eine Dehydratase-Aktivität, eine Reaktivierung-Aktivität und eine 1,3-Propandiol-Oxidoreductase. Typischerweise umfaßt ein *dha*-Regulon die offenen Leserahmen *dhaR*, *orfY*, *dhaT*, *orfX*, *orfW*, *dhaB1*, *dhaB2*, *dhaB3* und *orfZ*, wie sie hier beschrieben sind.

[0062] Der Begriff „nicht-spezifische katalytische Aktivität“ bezeichnet das (die) Polypeptid(e), das (die) für eine Enzymaktivität verantwortlich ist (sind), die ausreichend ist, die gegenseitige Umwandlung von 3-HPA und 1,3-Propandiol zu katalysieren, und schließt speziell 1,3-Propandiol-Oxidoreductase(n) aus. Typischerweise sind diese Enzyme Alkohol-Dehydrogenasen. Derartige Enzyme können Cofaktoren benutzen, die andere als NAD^+/NADH sind, einschließlich, ohne aber darauf begrenzt zu sein, Flavine wie beispielsweise FAD oder FMN. Es wird zum Beispiel gefunden, daß (ein) Gen(e) für (eine) nicht-spezifische Alkohol-Dehydrogenase(n) endogen codiert ist (sind) und funktionell innerhalb des Mikroorganismus *E. coli* KLP23 exprimiert wird (werden).

[0063] Die Begriffe „Funktion“ oder „Enzymfunktion“ bezeichnen die katalytische Aktivität eines Enzyms beim Verändern der Energie, die erforderlich ist, um eine spezielle chemische Reaktion durchzuführen. Es ist selbstverständlich, daß eine derartige Aktivität auf eine Reaktion im Gleichgewicht angewendet werden kann, wo die Herstellung von entweder Produkt oder Substrat unter geeigneten Bedingungen bewerkstelligt werden kann.

[0064] Die Begriffe „Polypeptid“ und „Protein“ werden austauschbar verwendet.

[0065] Die Begriffe „Kohlenstoffsubstrat“ und „Kohlenstoffquelle“ bezeichnen eine Kohlenstoffquelle, die imstande ist, durch Wirtsorganismen der vorliegenden Erfindung metabolisiert zu werden, und insbesondere Kohlenstoffquellen, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Monosacchariden, Oligosacchariden, Polysacchariden und ein-Kohlenstoff-Substraten oder Gemischen davon.

[0066] Die Begriffe „Wirtszelle“ oder „Wirtsmikroorganismus“ bezeichnen einen Mikroorganismus, der imstande ist, fremde oder heterologe Gene aufzunehmen und diese Gene zu exprimieren, wobei ein aktives Genprodukt erzeugt wird.

[0067] Die Begriffe „fremdes Gen“, „fremde DNA“, „heterologes Gen“ und „heterologe DNA“ bezeichnen genetisches Material, das nativ für einen Organismus ist, der durch verschiedenartige Mittel innerhalb eines

Wirtsmikroorganismus plaziert worden ist. Das interessierende Gen kann ein natürlich vorkommendes Gen, ein mutiertes Gen oder ein synthetisches Gen sein.

[0068] Die Begriffe „Transformation“ und „Transfektion“ bezeichnen die Erwerbung neuer Gene in einer Zelle nach der Einbringung von Nucleinsäure. Die erworbenen Gene können in chromosomale DNA integriert oder als extrachromosomale replizierende Sequenzen eingeführt werden. Der Begriff „Transformant“ bezeichnet das Produkt einer Transformation.

[0069] Der Begriff „genetisch verändert“ bezeichnet den Vorgang der Veränderung von Erbmateriale durch Transformation oder Mutation.

[0070] Die Begriffe „rekombinanter Mikroorganismus“ und transformierter Wirt“ bezeichnen einen Mikroorganismus, der mit heterologen oder fremden Genen oder extra Kopien von homologen Genen transformiert worden ist. Die rekombinanten Mikroorganismen der vorliegenden Erfindung exprimieren fremde Gene, codierend Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase (GPD1), Glycerol-3-Phosphatase (GPP2), Glycerol-Dehydratase (dhaB1, dhaB2 und dhaB3) und Dehydratase-Reaktivierungsfaktor (orfZ und orfX), für die Herstellung von 1,3-Propandiol aus geeigneten Kohlenstoffsubstraten. Der E. coli, transformiert mit diesen Genen, fehlt eine funktionelle dhaT. Ein Wirtsmikroorganismus, anders als E. coli, kann ebenfalls transformiert werden, um die offenbarten Gene und das Gen für die nicht-spezifische katalytische Aktivität für die gegenseitige Umwandlung von 3-HPA und 1,3-Propandiol zu enthalten, wobei 1,3-Propandiol-Oxidoreductase(n) (dhaT) speziell ausgeschlossen wird (werden).

[0071] „Gen“ bezeichnet ein Nucleinsäurefragment, das ein spezielles Protein, einschließlich regulatorische Sequenzen, vorausgehend (5' nicht codierend) und folgend (3' nicht codierend) der Codierungsregion, exprimiert. Die Begriffe „nativ“ und „Wildtyp“ bezeichnen ein Gen, wie es in der Natur mit seinen eigenen regulatorischen Sequenzen gefunden wird.

[0072] Die Begriffe „encoding (codierend)“ und „coding (codierend)“ bezeichnen den Vorgang, durch welchen ein Gen, über die Mechanismen von Transkription und Translation, eine Aminosäuresequenz erzeugt. Es ist selbstverständlich, daß der Vorgang der Codierung einer speziellen Aminosäuresequenz DNA-Sequenzen einschließt, die Basenänderungen beinhalten können, die keine Änderung in der codierten Aminosäure verursachen oder die Basenänderungen beinhalten, die eine oder mehrere Aminosäuren verändern können, aber nicht die funktionellen Eigenschaften des Proteins, codiert durch die DNA-Sequenz, beeinflussen. Es ist daher selbstverständlich, daß die Erfindung mehr als die speziellen beispielhaften Sequenzen einschließt.

[0073] Der Begriff „isoliert“ bezeichnet ein Protein oder eine DNA-Sequenz, die aus mindestens einer Komponente, mit der sie natürlicherweise verbunden ist, entfernt ist.

[0074] Ein „isoliertes Nucleinsäuremolekül“ ist ein Polymer von RNA oder DNA, das einzeln- oder doppelsträngig ist, wobei es gegebenenfalls synthetische, nicht-natürliche oder veränderte Nucleotidbasen enthält. Ein isoliertes Nucleinsäuremolekül in der Form eines Polymers von DNA kann aus einem oder mehreren Segmenten von cDNA, genomischer DNA oder synthetischer DNA bestehen.

[0075] „Im wesentlichen ähnlich“ bezeichnet Nucleinsäuremoleküle, bei denen Änderungen in einer oder mehreren Nucleotidbasen zur Substitution von einer oder mehreren Aminosäuren führen, aber nicht die funktionellen Eigenschaften des Proteins, codiert durch die DNA-Sequenz, beeinflussen. „Im wesentlichen ähnlich“ bezeichnet auch Nucleinsäuremoleküle, bei denen Änderungen in einer oder mehreren Nucleotidbasen nicht die Fähigkeit des Nucleinsäuremoleküls beeinflussen, Änderung der Genexpression durch Antisense- oder Co-Suppressionstechnologie zu vermitteln. „Im wesentlichen ähnlich“ bezeichnet auch Modifizierungen der Nucleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung (wie beispielsweise Deletion oder Insertion von einer oder mehreren Nucleotidbasen), die die funktionellen Eigenschaften des resultierenden Transkripts bezüglich der Fähigkeit, Veränderung der Genexpression durch Antisense- oder Co-Suppressionstechnologie oder Veränderung der funktionellen Eigenschaften des resultierenden Proteinmoleküls zu vermitteln, nicht wesentlich beeinflussen. Die Verbindung schließt mehr als die speziellen beispielhaften Sequenzen ein.

[0076] Zum Beispiel ist auf dem Fachgebiet bekannt, daß Veränderungen in einem Gen, welche zu der Herstellung einer chemisch äquivalenten Aminosäure an einer gegebenen Stelle führen, aber nicht die funktionellen Eigenschaften des codierten Proteins beeinflussen, gebräuchlich sind. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung sind Substitutionen als Austausch innerhalb einer der folgenden fünf Gruppen definiert:

1. Kleine aliphatische, nichtpolare oder leicht polare Reste: Ala, Ser, Thr (Pro, Gly);

2. Polare, negativ geladene Reste und ihre Amide: Asp, Asn, Glu, Gln;
3. Polare, positiv geladene Reste: His, Arg, Lys;
4. Große aliphatische, nichtpolare Reste: Met, Leu, Ile, Val (Cys); und
5. Große aromatische Reste: Phe, Tyr, Trp.

[0077] So kann ein Codon für die Aminosäure Alanin, eine hydrophobe Aminosäure, durch einen Codon, codierend einen anderen weniger hydrophoben Rest (wie beispielsweise Glycin) oder einen stärker hydrophoben Rest (wie beispielsweise Valin, Leucin oder Isoleucin), substituiert werden. Ähnlich kann von Änderungen, die zu Substitution eines negativ geladenen Rests für einen anderen (wie beispielsweise Asparaginsäure für Glutaminsäure) oder eines positiv geladenen Rests für einen anderen (wie beispielsweise Lysin für Arginin) führen, ebenfalls erwartet werden, ein funktionell äquivalentes Produkt zu erzeugen.

[0078] In vielen Fällen würde von Nucleotidänderungen, welche zu Veränderung der N-terminalen und C-terminalen Anteile des Proteinmoleküls führen, ebenfalls nicht erwartet werden, die Aktivität des Proteins zu verändern.

[0079] Jede der vorgeschlagenen Modifizierungen liegt innerhalb der routinemäßigen Geschicklichkeit auf dem Fachgebiet, wie es die Bestimmung der Retention der biologischen Aktivität der codierten Produkte ist. Darüber hinaus erkennt der Fachmann, daß durch diese Erfindung eingeschlossene, im wesentlichen ähnliche Sequenzen, auch durch ihre Fähigkeit definiert sind, unter stringenten Bedingungen (0,1 × SSC, 0,1% SDS, 65°C und gewaschen mit 2 × SSC, 0,1% SDS und nachfolgend 0,1 × SSC, 0,1% SDS) mit den hier beispielhaft veranschaulichten Sequenzen zu hybridisieren. Bevorzugte im wesentlichen ähnliche Nucleinsäurefragmente der vorliegenden Erfindung sind diejenigen Nucleinsäurefragmente, deren DNA-Sequenzen zu mindestens 80% identisch mit der DNA-Sequenz der hier berichteten Nucleinsäurefragmente sind. Stärker bevorzugte Nucleinsäurefragmente sind zu mindestens 90% identisch mit der DNA-Sequenz der hier berichteten Nucleinsäurefragmente. Am meisten bevorzugt sind Nucleinsäurefragmente, die zu mindestens 95% identisch mit der DNA-Sequenz der hier berichteten Nucleinsäurefragmente sind.

[0080] Ein Nucleinsäurefragment ist mit einem anderen Nucleinsäurefragment, wie beispielsweise einer cDNA, genomischen DNA oder RNA, „hybridisierbar“, wenn eine einzelsträngige Form des Nucleinsäurefragments mit dem anderen Nucleinsäurefragment unter den geeigneten Bedingungen von Temperatur und Ionenstärke der Lösung verschmelzen kann. Hybridisierungs- und Waschbedingungen sind bekannt und beispielhaft veranschaulicht bei Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Molekulares Klonieren: Ein Laborhandbuch), Zweite Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989), besonders Kapitel 11 und Tabelle 11.1 darin (hier gänzlich durch Bezugnahme einbezogen). Die Bedingungen von Temperatur und Ionenstärke bestimmen die „Stringenz“ der Hybridisierung. Zum vorbereitenden Screening für homologe Nucleinsäuren können Hybridisierungsbedingungen mit niedriger Stringenz, entsprechend einer T_m von 55°, verwendet werden, z.B. 5 × SSC, 0,1% SDS, 0,25% Milch und kein Formamid; oder 30% Formamid, 5 × SSC, 0,5% SDS. Hybridisierungsbedingungen mit mäßiger Stringenz entsprechen einer höheren T_m , z.B. 40% Formamid, mit 5 × oder 6 × SSC. Hybridisierung erfordert, daß die zwei Nucleinsäuren komplementäre Sequenzen enthalten, obwohl, abhängig von der Stringenz der Hybridisierung, Fehlpaarungen zwischen Basen möglich sind. Die geeignete Stringenz zum Hybridisieren von Nucleinsäuren hängt von der Länge der Nucleinsäuren und dem Grad der Komplementierung, auf dem Fachgebiet bekannten Variablen, ab. Je größer der Grad der Ähnlichkeit oder Homologie zwischen zwei Nucleotidsequenzen ist, desto größer ist der Wert von T_m für Hybride von Nucleinsäuren mit diesen Sequenzen. Die relative Stabilität (entsprechend höherer T_m) von Nucleinsäurehybridisierung nimmt in der folgenden Reihenfolge: RNA:RNA, DNA:RNA, DNA:DNA ab. Für Hybride mit mehr als 100 Nucleotiden in der Länge sind Gleichungen zum Berechnen von T_m abgeleitet worden (siehe Sambrook et al., vorstehend, 9.50–9.51). Für Hybridisierung mit kürzeren Nucleinsäuren, d.h. Oligonucleotiden, wird die Position von Fehlpaarungen wichtiger und die Länge des Oligonucleotids bestimmt seine Spezifität (siehe Sambrook et al., vorstehend, 11.7–11.8). In einer Ausführungsform beträgt die Länge für eine hybridisierbare Nucleinsäure mindestens etwa 10 Nucleotide. Vorzugsweise beträgt eine minimale Länge für eine hybridisierbare Nucleinsäure mindestens etwa 15 Nucleotide; stärker bevorzugt mindestens etwa 20 Nucleotide, und am meisten bevorzugt beträgt die Länge mindestens 30 Nucleotide. Weiterhin erkennt der Fachmann, daß die Temperatur und die Salzkonzentration der Waschlösung wie notwendig entsprechend Faktoren wie der Länge der Probe eingestellt werden können.

[0081] Ein „wesentlicher Anteil“ bezeichnet eine Aminosäure- oder Nucleotidsequenz, welche genug von der Aminosäuresequenz eines Polypeptids oder der Nucleotidsequenz eines Gens umfaßt, um mutmaßliche Identifizierung dieses Polypeptids oder Gens zu liefern, entweder durch manuelle Auswertung der Sequenz durch den Fachmann oder durch Computer-automatisierten Sequenzvergleich und Identifizierung unter Verwendung

von Algorithmen wie beispielsweise BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 40310 (1993); siehe auch www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Im allgemeinen ist eine Sequenz von zehn oder mehr benachbarten Aminosäuren oder dreißig oder mehr Nucleotiden notwendig, um ein Polypeptid oder eine Nucleinsäuresequenz mutmaßlich als homolog mit einem bekannten Protein oder Gen zu identifizieren. Darüber hinaus können im Hinblick auf Nucleotidsequenzen genspezifische Oligonucleotidsonden, umfassend 20–30 benachbarte Nucleotide, in sequenzabhängigen Verfahren der Genidentifizierung (z.B. Southern-Hybridisierung) und -isolierung (z.B. in-situ-Hybridisierung von Bakterienkolonien oder Bakteriophagenplaquen) verwendet werden. Außerdem können kurze Oligonucleotide von 12–15 Basen als Amplifikations-Primer in PCR verwendet werden, um ein spezielles Nucleinsäuremolekül, umfassend die Primer, zu erhalten. Dementsprechend umfaßt ein „wesentlicher Anteil“ einer Nucleotidsequenz genug von der Sequenz, um spezifische Identifizierung und/oder Isolierung eines die Sequenz umfassenden Nucleinsäuremoleküls zu liefern. Die vorliegende Beschreibung lehrt teilweise oder vollständige Aminosäure- und Nucleotidsequenzen, die ein oder mehrere spezielle Proteine codieren. Der Fachmann mit dem Vorteil der wie hier berichteten Sequenzen kann jetzt alle oder einen wesentlichen Teil der offenbarten Sequenzen für den dem Fachmann bekannten Zweck verwenden. Dementsprechend umfaßt die vorliegende Erfindung die vollständigen Sequenzen, wie sie in der begleitenden Sequenzauflistung berichtet sind, ebenso wie wesentliche Anteile dieser Sequenzen, wie sie vorstehend definiert sind.

[0082] Der Begriff „komplementär“ beschreibt die Beziehung zwischen Nucleotidbasen, die imstande sind, miteinander zu hybridisieren. Zum Beispiel ist im Hinblick auf DNA Adenosin komplementär zu Thymin, und Cytosin ist komplementär zu Guanin. Dementsprechend schließt die vorliegende Erfindung auch isolierte Nucleinsäuremoleküle ein, die komplementär zu den vollständigen Sequenzen sind, wie sie in der begleitenden Sequenzauflistung berichtet sind, ebenso wie die im wesentlichen ähnlichen Nucleinsäuresequenzen.

[0083] Der Begriff „Prozent Identität“, wie er auf dem Fachgebiet bekannt ist, ist eine Beziehung zwischen zwei oder mehreren Polypeptidsequenzen oder zwei oder mehreren Polynucleotidsequenzen, wie er durch Vergleichen der Sequenzen bestimmt wird. Auf dem Fachgebiet bedeutet „Identität“ auch den Grad der Sequenzverwandtschaft zwischen Polypeptid- oder Polynucleotidsequenzen, je nachdem, wie er durch die Übereinstimmung zwischen Ketten derartiger Sequenzen bestimmt wird. „Identität“ und „Ähnlichkeit“ können durch bekannte Verfahren leicht berechnet werden, einschließlich, ohne aber darauf beschränkt zu sein, derjenigen, die in: Computational Molecular Biology (Computermolekularbiologie); Lesk, A. M., Hrsg.; Oxford University Press: New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Biocomputing: Informatik und Genomprojekte); Smith, D. W., Hrsg.; Academic Press: New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Computeranalyse von Sequenzdaten, Teil 1); Griffin, A. M. and Griffin, H. G., Hrsg.; Humana Press: New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology (Sequenzanalyse in der Molekularbiologie); von Heinje, G., Hrsg.; Academic Press: New York, 1987; und Sequence Analysis Primer (Primer in der Sequenzanalyse); Gribskov, M. und Devereux, J., Hrsg.; Stockton Press: New York, 1991, beschrieben sind. Bevorzugte Verfahren zur Bestimmung der Identität werden gestaltet, um die größte Übereinstimmung zwischen den getesteten Sequenzen zu ergeben.

[0084] Verfahren zur Bestimmung von Identität und Ähnlichkeit sind in öffentlich zugänglichen Computerprogrammen codifiziert. Zu bevorzugten Verfahren mit Computerprogrammen zur Bestimmung von Identität und Ähnlichkeit zwischen zwei Sequenzen gehören, ohne aber darauf begrenzt zu sein, das Programm GCG Pile-up, gefunden in dem GCG-Programmpaket, die Verwendung des Algorithmus von Needleman und Wunsch mit ihren Standard-Default-Werten der Strafe der Lückenerzeugung = 12 und der Strafe der Lückenerweiterung = 4 (Devereux et al., Nucleic Acids Res. 12: 387–395 (1984)), BLASTP, BLASTN und FASTA (Pearson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444–2448 (1988)). Das BLASTX-Programm ist öffentlich von NCBI und anderen Quellen zugänglich (BLAST Manual, Altschul et al., Natl. Cent. Biotechnol. Inf., Natl. Library Med. (NCBI NLM) NIH, Bethesda, Md. 20894; Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403–410 (1990); Altschul et al., „Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs“ (BLAST und PSI-BLAST mit Lücken: eine neue Generation von Proteindatenbank-Suchprogrammen), Nucleic Acids Res. 25: 3389–2402 (1997)). Ein anderes bevorzugtes Verfahren zur Bestimmung der Prozent Identität geschieht durch das Verfahren des DNASTAR-Proteinausrichtungsprotokolls unter Verwendung des Jotun-Hein-Algorithmus (Hein et al., Methods Enzymol. 183: 626–645 (1990)). Default-Parameter für das Jotun-Hein-Verfahren zur Ausrichtung sind: für mehrfache Ausrichtungen, Lückenstrafe = 11, Strafe der Lückenlänge = 3; für paarweise Ausrichtungen ktuple = 6. Als Veranschaulichung ist es durch ein Polynucleotid mit einer Nucleotidsequenz mit zum Beispiel mindestens 95% „Identität“ zu einer Referenznucleotidsequenz beabsichtigt, daß die Nucleotidsequenz des Polynucleotids identisch mit der Referenzsequenz ist, außer daß die Polynucleotidsequenz bis zu fünf Punktmutationen pro jeweils 100 Nucleotide der Referenznucleotidsequenz einschließen kann. Mit anderen Worten können, um ein Polynucleotid mit einer Nucleotidsequenz zu erhalten, die zu mindestens 95% iden-

tisch mit einer Referenznucleotidsequenz ist, bis zu 5% der Nucleotide in der Referenzsequenz deletiert oder mit einem anderen Nucleotid substituiert sein, oder eine Anzahl von Nucleotiden von bis zu 5% der gesamten Nucleotide in der Referenzsequenz können in die Referenzsequenz insertiert sein. Diese Mutationen der Referenzsequenz können an der 5' oder 3' terminalen Position der Referenznucleotidsequenz oder irgendwo zwischen diesen terminalen Positionen, zerstreut entweder individuell unter Nucleotiden in der Referenzsequenz oder in einer oder mehreren benachbarten Gruppen innerhalb der Referenzsequenz erfolgen. Analog ist durch ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz mit zum Beispiel mindestens 95% Identität mit einer Referenzaminosäuresequenz beabsichtigt, daß die Aminosäuresequenz des Polypeptids identisch mit der Referenzsequenz ist, außer daß die Polypeptidsequenz bis zu fünf Aminosäureveränderungen pro jeweils 100 Aminosäuren der Referenzaminosäure einschließen kann. Mit anderen Worten können, um ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz zu erhalten, die zu mindestens 95% identisch mit einer Referenzaminosäuresequenz ist, bis zu 5% der Aminosäurereste in der Referenzsequenz deletiert oder mit einer anderen Aminosäure substituiert sein, oder eine Anzahl von Aminosäuren mit bis zu 5% der gesamten Aminosäurereste in der Referenzsequenz können in die Referenzsequenz insertiert sein. Diese Veränderungen der Referenzsequenz können in der Amino- oder Carboxy-terminalen Position der Referenzaminosäuresequenz oder irgendwo zwischen diesen terminalen Positionen, verstreut entweder individuell zwischen Resten in der Referenzsequenz oder in einer oder mehreren benachbarten Gruppen innerhalb der Referenzsequenz erfolgen.

[0085] Der Begriff „homolog“ bezeichnet ein Protein oder Polypeptid, nativ oder natürlich vorkommend in einer gegebenen Wirtszelle. Die Erfindung schließt Mikroorganismen ein, die homologe Proteine über rekombinante DNA-Technologie erzeugen.

[0086] Der Begriff „Prozent Homologie“ bezeichnet das Ausmaß der Aminosäuresequenzidentität zwischen Polypeptiden. Wenn eine erste Aminosäuresequenz identisch mit einer zweiten Aminosäuresequenz ist, dann zeigen die erste und zweite Aminosäuresequenz 100% Homologie. Die Homologie zwischen beliebigen zwei Polypeptiden ist eine direkte Funktion der Gesamtzahl von übereinstimmenden Aminosäuren an einer gegebenen Position in jeder Sequenz, z.B. wenn die Hälfte der Gesamtzahl von Aminosäuren in jeder der zwei Sequenzen die gleiche ist, dann sagt man, daß die zwei Sequenzen 50% Homologie zeigen.

[0087] „Codondegeneriertheit“ bezeichnet die Divergenz im genetischen Code, die Variation der Nucleotidsequenz gestattet, ohne die Aminosäuresequenz eines codierten Polypeptids zu beeinflussen. Dementsprechend verwendet die vorliegende Erfindung vorzugsweise ein Nucleinsäuremolekül, das alle oder einen wesentlichen Teil der Aminosäuresequenz, wie angegeben in SEQ ID NO:57, codiert. Der Fachmann ist sich der „Codon-Bias“ bewußt, der durch eine spezielle Wirtszelle beim Gebrauch von Nucleotidcodons gezeigt wird, um eine gegebene Nucleinsäure zu spezifizieren. Daher ist es, wenn ein Gen zur verbesserten Expression in einer Wirtszelle synthetisiert wird, wünschenswert, das Gen derart zu gestalten, daß seine Frequenz des Codongebrauchs sich der Frequenz des bevorzugten Codongebrauchs der Wirtszelle annähert.

[0088] Modifizierungen für die Sequenz, wie beispielsweise Deletionen, Insertionen oder Substitutionen in der Sequenz, welche stille Veränderungen erzeugen, die die funktionellen Eigenschaften des resultierenden Proteinmoleküls nicht wesentlich beeinflussen, werden ebenfalls in Erwägung gezogen. Zum Beispiel wird Veränderung in der Gensequenz, welche die Degeneriertheit des genetischen Codes widerspiegelt oder welche zu der Erzeugung einer chemisch äquivalenten Aminosäure an einer gegebenen Stelle führt, in Erwägung gezogen. So kann ein Codon für die Aminosäure Alanin, eine hydrophobe Aminosäure, durch ein Codon, codierend einen anderen weniger hydrophoben Rest, wie beispielsweise Glycin, oder einen stärker hydrophoben Rest, wie beispielsweise Valin, Leucin oder Isoleucin, substituiert sein. Ähnlich kann von Änderungen, welche zu Substitution eines negativ geladenen Rests für einen anderen, wie beispielsweise Asparaginsäure für Glutaminsäure, oder eines positiv geladenen Rests für einen anderen, wie beispielsweise Lysin für Arginin, führen, ebenfalls erwartet werden, ein biologisch äquivalentes Produkt zu erzeugen. Von Nucleotidänderungen, welche zu Veränderung der N-terminalen und C-terminalen Anteile des Proteinmoleküls führen, würde ebenfalls nicht erwartet werden, die Aktivität des Proteins zu verändern. In einigen Fällen kann es tatsächlich wünschenswert sein, Mutanten der Sequenz herzustellen, um den Einfluß von Veränderung auf die biologische Aktivität des Proteins zu untersuchen. Jede der vorgeschlagenen Modifizierungen liegt innerhalb der routinemäßigen Geschicklichkeit auf dem Fachgebiet, wie es die Bestimmung der Retention von biologischer Aktivität in den codierten Produkten ist. Darüber hinaus erkennt der Fachmann, daß die Sequenzen, eingeschlossen von dieser Erfindung, auch durch ihre Fähigkeit definiert sind, unter stringenten Bedingungen (0,1 × SSC, 0,1% SDS, 65°C) mit den hier beispielhaft veranschaulichten Sequenzen zu hybridisieren.

[0089] Der Begriff „Expression“ bezeichnet die Transkription und Translation zum Genprodukt von einem Gen, codierend für die Sequenz des Genprodukts.

[0090] Die Begriffe „Plasmid“, „Vektor“ und „Kassette“ bezeichnen ein extra-chromosomales Element, das oft Gene trägt, die nicht Teil des zentralen Metabolismus der Zelle und gewöhnlich in der Form von zirkulären doppelsträngigen DNA-Molekülen sind. Derartige Elemente können autonom replizierende Sequenzen, Genom integrierende Sequenzen, Phagen- oder Nucleotidsequenzen, linear oder zirkulär, von einer einzel- oder doppelsträngigen DNA oder RNA, abgeleitet von einem beliebigen Ausgangsstoff, in welchem eine Anzahl von Nucleotidsequenzen in eine einzigartige Konstruktion verbunden oder rekombiniert worden sind, welche imstande ist, ein Promotorfragment und eine DNA-Sequenz für ein ausgewähltes Genprodukt zusammen mit geeigneter 3' untranslatierter Sequenz in eine Zelle einzuführen, sein. „Transformationskassette“ bezeichnet einen spezifischen Vektor, enthaltend ein fremdes Gen und mit Elementen zusätzlich zu dem fremden Gen, der die Transformation einer speziellen Wirtszelle erleichtert. „Expressionskassette“ bezeichnet einen spezifischen Vektor, enthaltend ein fremdes Gen und mit Elementen zusätzlich zu dem fremden Gen, der erhöhte Expression dieses Gens in einem fremden Wirt erlaubt.

KONSTRUKTION VON REKOMBINANTEN ORGANISMEN

[0091] Rekombinante Organismen, enthaltend die notwendigen Gene, die den enzymatischen Weg für die Umwandlung eines Kohlenstoffsubstrats in 1,3-Propandiol codieren, können unter Verwendung von Techniken konstruiert werden, die auf dem Fachgebiet bekannt sind. Gene, codierend Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase (GPDH), Glycerol-3-Phosphatase (GPP2), Glycerol-Dehydratase (dhaB1, dhaB2 und dhaB3), Dehydratase-Reaktivierungsfaktor (orfZ und orfX) und 1,3-Propandiol-Oxidoreductase (dhaT), wurden aus einem nativen Wirt wie beispielsweise *Klebsiella* oder *Saccharomyces* isoliert und verwendet, um Wirtsstämme wie beispielsweise *E. coli* DH5 α , ECL707, AA200 oder KLP23 zu transformieren.

ISOLIERUNG VON GENEN

[0092] Verfahren zum Erhalt gewünschter Gene aus einem bakteriellen Genom sind gebräuchlich und auf dem Fachgebiet der Molekularbiologie bekannt. Zum Beispiel können, wenn die Sequenz des Gens bekannt ist, geeignete Genbanken durch Digestion mit Restriktionsendonuclease erzeugt werden und können mit zu der gewünschten Gensequenz komplementären Sonden gescreent werden. Sobald die Sequenz isoliert ist, kann die DNA unter Verwendung von Standardprimer-gerichteten Amplifikationsmethoden, wie beispielsweise Polymerasekettenreaktion (PCR) (US-4683202), amplifiziert werden, um Mengen von DNA, geeignet zur Transformation unter Verwendung geeigneter Vektoren, zu erhalten.

[0093] Alternativ können Cosmid-Bibliotheken erzeugt werden, wo große Segmente von genomischer DNA (35–45 kb) in Vektoren verpackt und verwendet werden können, um geeignete Wirte zu transformieren. Cosmid-Vektoren sind einzigartig, indem sie imstande sind, große Mengen von DNA unterzubringen. Im allgemeinen weisen Cosmid-Vektoren mindestens eine Kopie der cos-DNA-Sequenz auf, welche zur Verpackung und nachfolgenden Zirkularisierung der fremden DNA benötigt wird. Zusätzlich zu der cos-Sequenz werden diese Vektoren auch einen Replikationsursprung wie beispielsweise ColE1 und Marker für Arzneimittelresistenz wie beispielsweise ein Gen, resistent gegen Ampicillin oder Neomycin, enthalten. Verfahren der Verwendung von Cosmid-Vektoren für die Transformation geeigneter bakterieller Wirte sind bei Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Molekulares Klonieren: Ein Laborhandbuch), Zweite Auflage (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

[0094] Typischerweise wird, um Cosmide zu klonieren, fremde DNA isoliert und ligiert, wobei geeignete Restriktionsendonucleasen, angrenzend an die cos-Region des Cosmid-Vektors, verwendet werden. Cosmid-Vektoren, die die linearisierte fremde DNA enthalten, werden dann mit einem DNA-Verpackungsvehikel wie beispielsweise einem Bakteriophagen umgesetzt. Während des Verpackungsvorgangs werden die cos-Stellen gespalten und wird die fremde DNA in den Kopfteil des bakteriell-viralen Teilchens verpackt. Diese Teilchen werden dann verwendet, um geeignete Wirtszellen wie beispielsweise *E. coli* zu transfizieren. Sobald in die Zelle injiziert, zirkularisiert die fremde DNA unter dem Einfluß der klebrigen Enden von cos. In dieser Weise können große Segmente fremder DNA eingeführt und in rekombinanten Wirtszellen exprimiert werden.

Isolierung und Klonierung von Genen, codierend Glycerol-Dehydratase (dhaB1, dhaB2 und dhaB3), Dehydratase-Reaktivierungsfaktoren (orfZ und orfX) und 1,3-Propandiol-Dehydrogenase (dhaT)

[0095] Cosmid-Vektoren und Cosmid-Transformationsverfahren wurden innerhalb des Zusammenhangs der vorliegenden Erfindung verwendet, um große Segmente von genomischer DNA aus Bakteriengattungen zu klonieren, von denen bekannt ist, daß sie Gene, imstande zur Verarbeitung von Glycerol zu 1,3-Propandiol, besitzen. Speziell wurde genomische DNA aus *K. pneumoniae* durch auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren

isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3A zur Insertion in einen Cosmid-Vektor Supercos 1 digestiert und unter Verwendung von GigapackII-Verpackungsextrakten verpackt. Nach Konstruktion des Vektors E. coli XL1-Blue MR wurden Zellen mit der Cosmid-DNA transformiert. Transformanten wurden auf die Fähigkeit gescreent, Glycerol in 1,3-Propandiol umzuwandeln, indem die Zellen in Anwesenheit von Glycerol gezüchtet wurden und die Medien auf 1,3-Propandiol-Erzeugung analysiert wurden.

[0096] Zwei von den 1,3-Propandiol-positiven Transformanten wurden analysiert und die Cosmide wurden pKP1 und pKP2 genannt. DNA-Sequenzierung enthüllte extensive Homologie mit dem Glycerol-Dehydratase-Gen aus *C. freundii*, wobei demonstriert wurde, daß diese Transformanten DNA, codierend das Glycerol-Dehydratase-Gen, enthielten. Andere 1,3-Propandiol-positiv transformierte Transformanten wurden analysiert und die Cosmide wurden pKP4 und pKP5 genannt. DNA-Sequenzierung enthüllte, daß diese Cosmide DNA, codierend ein Diol-Dehydratase-Gen, trugen.

[0097] Obwohl die vorliegende Erfindung die isolierten Gene aus dem Inneren eines Klebsiella-Cosmids benutzt, gehören zu alternativen Ausgangsstoffen von Dehydratase-Genen und Dehydratase-Reaktivierungsfaktor-Genen, ohne aber darauf begrenzt zu sein, Citrobacter, Clostridia und Salmonella (siehe Tabelle 1).

GENE, CODIEREND G3PDH UND G3P-PHOSPHATASE

[0098] Die vorliegende Erfindung verwendet Gene, die für die Expression von G3PDH- und G3P-Phosphatase-Aktivitäten in einer Wirtszelle geeignet sind.

[0099] Gene, die G3PDH codieren, sind bekannt. Zum Beispiel wurde GPD1 aus *Saccharomyces* isoliert und hat die Basensequenz, gegeben durch SEQ ID NO:53, codierend die Aminosäuresequenz, gegeben in SEQ ID NO:54 (Wang et al., vorstehend). Ähnlich wurde G3PDH-Aktivität auch aus *Saccharomyces*, codiert durch GPD2, isoliert (Eriksson et al., *Mol. Microbiol.* 17, 95 (1995)).

[0100] Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung wird in Erwägung gezogen, daß ein Gen, codierend ein Polypeptid, verantwortlich für NADH-abhängige G3PDH-Aktivität, geeignet ist, wobei diese Aktivität imstande ist, die Umwandlung von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) in Glycerol-3-phosphat (G3P) zu katalysieren. Weiter wird in Erwägung gezogen, daß ein Gen, codierend die Aminosäuresequenz von NADH-abhängigen G3PDHs entsprechend den Genen DAR1, GPD1, GPD2, GPD3 und *gpsA*, in der vorliegenden Erfindung funktionell sein wird, wobei diese Aminosäuresequenz Aminosäuresubstitutionen, -deletionen oder -additionen einschließen kann, die die Funktion des Enzyms nicht verändern. Der Fachmann ist sich bewußt, daß Gene, codierend G3PDH, isoliert aus anderen Ausgangsstoffen, ebenfalls zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignet sein werden. Gene, codierend G3P-Phosphatase, sind bekannt. Zum Beispiel ist GPP2 aus *Saccharomyces cerevisiae* isoliert worden und hat die Basensequenz, gegeben durch SEQ ID NO:55, welche die Aminosäuresequenz, gegeben in SEQ ID NO:56, codiert (Norbeck et al., *J. Biol. Chem.* 271, 13875 (1996)).

[0101] Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung ist ein Gen, codierend eine G3P-Phosphatase-Aktivität, zur Verwendung in dem Verfahren geeignet, wobei diese Aktivität imstande ist, die Umwandlung von Glycerol-3-phosphat plus H_2O in Glycerol plus anorganisches Phosphat zu katalysieren. Weiter wird ein Gen, codierend die Aminosäuresequenz von G3P-Phosphatase, entsprechend den Genen GPP2 und GPP1, funktionell in der vorliegenden Erfindung sein, einschließend eine Aminosäuresequenz, die Aminosäuresubstitutionen, -deletionen oder -additionen einschließt, die nicht die Funktion des G3P-Phosphatase-Enzyms verändern. Der Fachmann ist sich bewußt, daß Gene, codierend G3P-Phosphatase, isoliert aus anderen Ausgangsstoffen, ebenfalls zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignet sein werden.

WIRTSZELLEN

[0102] Geeignete Wirtszellen für die rekombinante Herstellung von 1,3-Propandiol können entweder prokaryotisch oder eukaryotisch sein und sind nur durch die Fähigkeit der Wirtszelle begrenzt, die aktiven Enzyme für den 1,3-Propandiol-Weg zu exprimieren. Geeignete Wirtszellen sind Bakterien wie beispielsweise *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Aerobacter*, *Lactobacillus*, *Aspergillus*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Mucor*, *Torulopsis*, *Methylobacter*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Streptomyces* und *Pseudomonas*. Bevorzugt in der vorliegenden Erfindung sind *E. coli*, *E. blattae*, *Klebsiella*, *Citrobacter* und *Aerobacter*.

[0103] Mikroorganismen können in einen 1,3-Propandiol-Erzeuger mit hohem Titer umgewandelt werden, indem das folgende allgemeine Protokoll verwendet wird.

1. Bestimmen der Anwesenheit einer endogenen dhaT-artigen Aktivität in einem potentiellen Wirtsorganismus, die die Konzentration eines toxischen oder hemmenden Niveaus von 3-HPA in Anwesenheit von 1–2 M 1,3-Propanediol im stationären Zustand erlaubt.
2. Wenn eine derartige Aktivität in dem potentiellen Wirtsorganismus existiert, Durchführen geeigneter Mutagenese zur Deletierung oder Inaktivierung dieser Aktivität. Bestätigung einer nicht-funktionellen oder deletierten dhaT-artigen Aktivität kann durch das Fehlen von 3-HPA-Ansammlung in Anwesenheit von 1–2 M 1,3-Propanediol nachgewiesen werden.
3. Exprimieren geeigneter Gene für a) Glycerolerzeugung, wenn Glycerol nicht die Kohlenstoffquelle ist, b) Glycerol-Dehydratase und das damit verbundene Pflegesystem und c) yqhD.

[0104] Überlegungen, welche in bezug auf bestimmte Mikroorganismen würden angestellt werden müssen, betreffen die Expression oder Repression endogener dhaT-artiger Enzyme unter den Bedingungen für die 1,3-Propanediol-Herstellung. Diese könnten auch die Anwesenheit von Glycerol, Glucose oder Anaerobiose einschließen.

VEKTOREN UND EXPRESSIONSKASSETTEN

[0105] Die vorliegende Erfindung stellt eine Vielfalt von Vektoren und Transformations- und Expressionskassetten, geeignet für die Klonierung, Transformation und Expression von G3PDH, G3P-Phosphatase, Dehydratase und Dehydratase-Reaktivierungsfaktor in eine geeignete Wirtszelle bereit. Geeignete Vektoren werden diejenigen sein, welche mit dem angewendeten Mikroorganismus verträglich sind. Geeignete Vektoren können zum Beispiel von einem Bakterium, einem Virus (wie beispielsweise der Bakteriophage T7 oder ein M-13-abgeleiteter Phage), einem Cosmid, einer Hefe oder einer Pflanze abgeleitet werden. Protokolle zum Erhalt und zur Verwendung derartiger Vektoren sind dem Fachmann bekannt (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Molekulares Klonieren: Ein Laborhandbuch), Band 1, 2, 3 (Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY, 1989)).

[0106] Typischerweise enthält der Vektor oder die Kassette Sequenzen, die Transkription und Translation des entsprechenden Gens richten, einen auswählbaren Marker und Sequenzen, die die autonome Replikation oder chromosomale Integration erlauben. Geeignete Vektoren umfassen eine Region 5' von dem Gen, welche transkriptionelle Initiationskontrollen beherbergt, und eine Region 3' von dem DNA-Fragment, welche transkriptionelle Termination kontrolliert. Es wird am meisten bevorzugt, wenn beide Kontrollregionen von Genen abgeleitet sind, die homolog zu der transformierten Wirtszelle sind. Derartige Kontrollregionen brauchen nicht von den Genen abgeleitet zu sein, die nativ für die spezielle Spezies, ausgewählt als Produktionswirt, sind.

[0107] Initiationskontrollregionen oder Promotoren, welche verwendbar sind, um Expression der G3PDH- und G3P-Phosphatase-Gene (DAR1 bzw. GPP2) in der gewünschten Wirtszelle zu steuern, sind zahlreich und dem Fachmann bekannt. Praktisch jeder Promotor, der imstande ist, diese Gene zu steuern, ist für die vorliegende Erfindung geeignet, einschließlich, ohne aber darauf begrenzt zu sein CYC1, HIS3, GAL1, GAL10, ADH1, PGK, PHO5, GAPDH, ADC1, TRP1, URA3, LEU2, ENO und TP1 (verwendbar für Expression in *Saccharomyces*); AOX1 (verwendbar für Expression in *Pichia*); und lac, trp, λP_L , λP_R , T7, tac und trc (verwendbar für Expression in *E. coli*).

[0108] Terminationskontrollregionen können auch von verschiedenartigen Genen abgeleitet werden, die nativ für die bevorzugten Wirte sind. Gegebenenfalls kann eine Terminationsstelle unnötig sein: jedoch wird es am meisten bevorzugt, wenn sie eingeschlossen ist.

[0109] Für effektive Expression der vorliegenden Enzyme werden DNA, codierend die Enzyme, operabel durch Initiationscodons mit ausgewählten Expressionskontrollregionen verknüpft, derart, daß Expression zu der Bildung der passenden Messenger-RNA führt.

[0110] Besonders nützlich in der vorliegenden Erfindung ist der Vektor pKP32, welcher gestaltet ist, um in Verbindung mit pAH48 verwendet zu werden. Die wesentlichen Elemente von pKP32 sind von dem dha-Regulon abgeleitet, das aus *Klebsiella pneumoniae* isoliert ist. pKP32 enthält die offenen Leserahmen dhaR, orfY, orfX, orfW, dhaB1, dhaB2 und dhaB3, deren Nucleotidsequenzen innerhalb SEQ ID NO:1 enthalten sind. pAH48 ist das Vehikel, das für die Einführung von DAR1- und GPP2-Genen in die Wirtszelle verwendet wird und umfaßt genauer gesagt die aus *Saccharomyces cerevisiae* isolierten DAR1- und GPP2-Gene.

TRANSFORMATION GEEIGNETER WIRTE UND EXPRESSION VON GENEN FÜR DIE HERSTELLUNG VON 1,3-PROPANDIOL

[0111] Sobald geeignete Kassetten konstruiert sind, werden sie verwendet, um geeignete Wirtszellen zu transformieren. Einführung der Kasette, enthaltend die Gene, codierend G3PDH, G3P-Phosphatase, Dehydratase und Dehydratase-Reaktivierungsfaktor in die Wirtszelle, kann durch bekannte Verfahrensweisen wie beispielsweise durch Transformation (z.B. unter Verwendung von Calcium-permeabilisierten Zellen, Elektroporation) oder durch Transfektion unter Verwendung eines rekombinanten Phagenvirus (Sambrook et al., vorstehend) bewerkstelligt werden.

[0112] In der vorliegenden Erfindung wurden Kassetten verwendet, um die E. coli zu transformieren, wie vollständig in den Allgemeinen Verfahren und den Beispielen beschrieben ist.

MUTANTEN

[0113] Zusätzlich zu den beispielhaft veranschaulichten Zellen wird in Erwägung gezogen, daß das vorliegende Verfahren imstande ist, Gebrauch von Zellen mit einzelnen oder mehrfachen Mutationen zu machen, die speziell gestaltet sind, um die Herstellung von 1,3-Propandiol zu erhöhen. Zellen, die normalerweise eine Zufuhr von Kohlenstoffausgangsmaterial in nichtproduktive Wege ableiten oder die wesentliche Katabolitrepression zeigen, könnten mutiert werden, um diese phänotypischen Mängel zu vermeiden. Zum Beispiel werden viele Wildtypzellen der Katabolitrepression von Glucose und Nebenprodukten in den Medien unterworfen und es wird in Erwägung gezogen, daß zur 1,3-Propandiol-Herstellung fähige mutante Stämme dieser Wildtyporganismen, die resistent gegen Glucoserepression sind, in der vorliegenden Erfindung besonders nützlich sein würden.

[0114] Verfahren der Erzeugung von Mutanten sind gebräuchlich und auf dem Fachgebiet bekannt. Zum Beispiel können Wildtypzellen einer Vielfalt mit Mitteln, wie beispielsweise Strahlung oder chemische Mutagene, ausgesetzt und dann für den gewünschten Phänotyp gescreent werden. Wenn Mutationen durch Strahlung erzeugt werden, kann entweder ultraviolette (UV) oder ionisierende Strahlung verwendet werden. Geeignete kurzwellige UV-Wellenlängen für genetische Mutationen fallen in den Bereich von 200 nm bis 300 nm, wobei 254 nm bevorzugt werden. UV-Strahlung in dieser Wellenlänge verursacht hauptsächlich Änderungen innerhalb der Nucleinsäuresequenz von Guanidin und Cytosin bis Adenin und Thymin. Da alle Zellen DNA-Reparaturmechanismen haben, die die meisten UV-induzierten Mutationen reparieren würden, können Mittel wie beispielsweise Coffein und andere Inhibitoren hinzugegeben werden, um den Reparaturvorgang zu unterbrechen und die Anzahl von wirksamen Mutationen zu maximieren. Mutationen mit langwelligem UV unter Verwendung von Licht in dem Bereich von 300 nm bis 400 nm sind ebenfalls möglich, aber sind im allgemeinen nicht so wirksam wie die mit dem kurzwelligen UV-Licht, wenn sie nicht in Verbindung mit verschiedenartigen Aktivatoren wie beispielsweise Psoralenfarbstoffen verwendet werden, die mit der DNA wechselwirken.

[0115] Mutagenese mit chemischen Mitteln ist ebenfalls zum Erzeugen von Mutanten wirksam und zu gewöhnlich verwendeten Substanzen gehören Chemikalien, die nichtreplizierende DNA beeinflussen, wie beispielsweise HNO_2 und NH_2OH , ebenso wie Mittel, die replizierende DNA beeinflussen, wie beispielsweise Acridinfarbstoffe, beachtenswert zur Bewirkung von Frameshift-Mutationen. Spezielle Verfahren zur Erzeugung von Mutanten unter Verwendung von Strahlung oder chemischen Mitteln sind auf dem Fachgebiet gut dokumentiert. Siehe zum Beispiel Thomas D. Brock in *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology* (Biotechnologier: Ein Lehrbuch der industriellen Mikrobiologie), Zweite Auflage (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, oder Deshpande, Mukund V., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 36, 227 (1992).

[0116] Nachdem Mutagenese erfolgt ist, können Mutanten mit dem gewünschten Phänotyp durch eine Vielfalt von Verfahren ausgewählt werden. Zufallsscreening ist am meisten gebräuchlich, wo die mutagenisierten Zellen für die Fähigkeit ausgewählt werden, das gewünschte Produkt oder die Zwischenverbindung zu erzeugen. Alternativ kann selektive Isolierung von Mutanten durchgeführt werden, indem eine mutagenisierte Population auf selektiven Medien gezüchtet wird, wo nur resistente Kolonien sich entwickeln können. Verfahren zur Mutantenauswahl sind hochentwickelt und auf dem Fachgebiet der industriellen Mikrobiologie bekannt. Siehe zum Beispiel Brock, vorstehend; DeMancilha et al., *Food Chem.* 14, 313 (1984).

[0117] Die Eliminierung einer ungewünschten Enzymaktivität kann auch durch Disruption des das Enzym codierenden Gens bewerkstelligt werden. Derartige Verfahren sind dem Fachmann bekannt und sind in Beispiel 4 und Beispiel 8 beispielhaft dargestellt.

VERÄNDERUNGEN IN DEM WEG DER HERSTELLUNG VON 1,3-PROPANDIOL

[0118] Repräsentativer Enzymweg. Die Herstellung von 1,3-Propandiol aus Glucose kann durch die folgende Reihe von Schritten bewerkstelligt werden. Diese Reihe ist für eine Anzahl von dem Fachmann bekannten Wegen repräsentativ und ist in [Fig. 5](#) veranschaulicht. Glucose wird durch Enzyme des Glykolyseweges in einer Reihe von Schritten zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und 3-Phosphoglycerinaldehyd (3-PG) umgewandelt. Glycerol wird dann durch entweder Hydrolyse von DHAP zu Dihydroxyaceton (DHA) und nachfolgende Reduktion oder Reduktion von DHAP zu Glycerol-3-phosphat (G-3-P) und nachfolgende Hydrolyse erzeugt. Der Hydrolyseschritt kann durch eine Anzahl von zellulären Phosphatasen katalysiert werden, von denen bekannt ist, daß sie nicht-spezifisch im Hinblick auf ihre Substrate sind, oder die Aktivität kann in den Wirt durch Rekombination eingeführt werden. Der Reduktionsschritt kann durch ein NAD⁺-(oder NADP⁺)-verknüpftes Wirtsenzym katalysiert werden, oder die Aktivität kann durch Rekombination in den Wirt eingeführt werden. Es ist bemerkenswert, daß das dha-Regulon eine Glycerol-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.6) enthält, die die reversible Reaktion von Gleichung 3 katalysiert.



[0119] Glycerol wird über die Zwischenverbindung 3-Hydroxypropionaldehyd (3-HPA) in 1,3-Propandiol umgewandelt, wie vorstehend ausführlich beschrieben worden ist. Die Zwischenverbindung 3-HPA wird aus Glycerol, Gleichung 1, durch ein Dehydratase-Enzym erzeugt, das durch den Wirt codiert werden kann oder in den Wirt durch Rekombination eingeführt werden kann. Diese Dehydratase kann Glycerol-Dehydratase (E.C. 4.2.1.30), Diol-Dehydratase (E.C. 4.2.1.28) oder irgendein anderes Enzym, imstande, diese Transformation zu katalysieren, sein. Glycerol-Dehydratase, aber nicht Diol-Dehydratase, wird durch das dha-Regulon codiert. 1,3-Propandiol wird aus 3-HPA, Gleichung 2, durch ein NAD⁺- oder (NADP⁺)-verknüpftes Wirtsenzym hergestellt, oder die Aktivität kann in den Wirt durch Rekombination eingeführt werden. Diese finale Reaktion in der Herstellung von 1,3-Propandiol kann durch 1,3-Propandiol-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.202) oder andere Alkohol-Dehydrogenasen katalysiert werden.

[0120] Mutationen und Transformationen, die die Kohlenstoffkanalbildung beeinflussen. Eine Vielfalt von mutanten Mikroorganismen, umfassend Variationen in dem Weg der 1,3-Propandiol-Herstellung, sind in der vorliegenden Erfindung verwendbar. Zum Beispiel ist die Einführung einer Triosephosphat-Isomerase-Mutation (tpi-) in den Mikroorganismus der vorliegenden Erfindung ein Beispiel der Verwendung einer Mutation, um die Leistung durch Kohlenstoffkanalbildung zu verbessern. Triosephosphat-Isomerase ist das Enzym, verantwortlich für die Umwandlung von DAHP in 3-Phosphoglycerinaldehyd und erlaubt als solches die Ablenkung des Kohlenstoff Flusses von der Form des Hauptweges von Glucose zu Glycerol und 1,3-Propandiol ([Fig. 5](#)). So erhöht die Deletionsmutation (tpi-) die gesamte metabolische Effizienz des gewünschten Weges gegenüber der auf dem Fachgebiet beschriebenen. Ähnlich würden Mutationen, welche alternative Wege für Zwischenverbindungen des Weges der 1,3-Propandiol-Herstellung blockieren, ebenfalls für die vorliegende Erfindung nützlich sein. Zum Beispiel verhindert die Eliminierung von Glycerol-Kinase, daß Glycerol, erzeugt aus G3P durch die Wirkung von G3P-Phosphatase, auf Kosten von ATP zu G3P zurückverwandelt wird ([Fig. 5](#)). Auch die Eliminierung von Glycerol-Dehydrogenase (zum Beispiel gldA) verhindert, daß Glycerol, erzeugt aus DHAP durch die Wirkung von NADH-abhängiger Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase, in Dihydroxyaceton umgewandelt wird ([Fig. 5](#)). Mutationen können zu einem strukturellen Gen gerichtet werden, um die Aktivität einer enzymatischen Aktivität zu vermitteln oder zu verbessern, oder können zu einem regulatorischen Gen, einschließlich Promotorregionen und Ribosombindungsstellen, gerichtet werden, um das Expressionsniveau einer enzymatischen Aktivität zu modulieren.

[0121] Es wird so in Erwägung gezogen, daß Transformationen und Mutationen kombiniert werden können, um für die Erhöhung der 1,3-Propandiol-Herstellung spezielle Enzymaktivitäten zu steuern. So ist es innerhalb des Bereichs der vorliegenden Erfindung, Modifizierungen eines Ganzzellenkatalysators zu erwarten, welche zu einer erhöhten Herstellung von 1,3-Propandiol führen.

[0122] Die vorliegende Erfindung benutzt einen bevorzugten Weg für die Herstellung von 1,3-Propandiol aus einem Zuckersubstrat, wo der Kohlenstoff-Fluß sich von Glucose zu DHAP, G3P, Glycerol, 3-HPA und schließlich zu 1,3-Propandiol bewegt. Die vorliegenden Produktionsstämme sind bearbeitet worden, um die metabolische Effizienz des Weges zu maximieren, indem verschiedenartige Deletionsmutationen eingebracht werden,

die die Ableitung von Kohlenstoff zu nichtproduktiven Verbindungen verhindern. Glycerol kann von der Umwandlung zu 3HPA durch Überführung in entweder DHA oder G3P über Glycerol-Dehydrogenase oder Glycerol-Kinase abgelenkt werden, wie vorstehend diskutiert wurde (Fig. 5). Dementsprechend enthalten die vorliegenden Produktionsstämme Deletionsmutationen in den *gldA*- und *glpK*-Genen. Ähnlich kann DHAP durch Triosephosphat-Isomerase zu 3-PG abgeleitet werden, so enthält der vorliegende Produktionsmikroorganismus auch eine Deletionsmutation in diesem Gen. Das vorliegende Verfahren bringt zusätzlich ein Dehydratase-Enzym für die Umwandlung von Glycerol in 3HPA ein, welches in Abstimmung mit dem Reaktivierungsfaktor, codiert durch *orfX* und *orfZ* des *dha*-Regulons, funktioniert (Fig. 5). Obwohl Umwandlung des 3HPA in 1,3-Propandiol typischerweise über eine 1,3-Propandiol-Oxidoreductase bewerkstelligt wird, benutzt das vorliegende Verfahren eine nicht-spezifische katalytische Aktivität, die größere Titer und Ausbeuten des finalen Produkts 1,3-Propandiol erzeugt (Fig. 5). In einem derartigen Verfahren werden Titer von 1,3-Propandiol von mindestens 10 g/l erreicht, wo Titer von 200 g/l erwartet werden.

[0123] Alternativ kann ein verbessertes Verfahren für 1,3-Propandiol-Herstellung Glycerol oder Dihydroxyaceton als Substrat benutzen, wo der Weg nur die letzten drei Substrate, Glycerol → 3HPA → 1,3-Propandiol, umfaßt. In einem derartigen Verfahren wird die Oxidoreductase wieder zugunsten der nicht-spezifischen katalytischen Aktivität (von der erwartet wird, daß sie eine Alkohol-Dehydrogenase ist) eliminiert, jedoch wird die Notwendigkeit für Deletionsmutationen durch die Energieüberlegungen des Hinzufügens von Glycerol zu der Kultur aufgehoben. In einem derartigen Verfahren werden Titer von 1,3-Propandiol von mindestens 71 g/l erreicht, wo Titer von 200 g/l erwartet werden.

[0124] Die Mutanten von Wildtyp-Mikroorganismen sind durch die Deletion oder Mutation der *dhaT*-Aktivität modifiziert worden, um verbesserte 1,3-Propandiol-Produzenten zu erzeugen. Zum Beispiel können Mikroorganismen, welche natürlicherweise alle Elemente des *dha*-Regulons enthalten, manipuliert werden, um das *dhaT*-Gen, codierend die 1,3-Propandiol-Oxidoreductase-Aktivität, zu inaktivieren. Von diesen Mikroorganismen wird erwartet, daß sie höhere Ausbeuten und Titer von 1,3-Propandiol erzeugen, vermittelt durch die Anwesenheit einer endogenen katalytischen Aktivität, von der erwartet wird, daß sie eine Alkohol-Dehydrogenase ist. Zu Beispielen derartiger Mikroorganismen gehören, ohne aber darauf begrenzt zu sein, *Citrobacter* sp. und *Clostridium* sp.

Medien und Kohlenstoffsubstrate

[0125] Fermentationsmedien in der vorliegenden Erfindung müssen geeignete Kohlenstoffsubstrate enthalten. Zu geeigneten Substraten können, ohne aber darauf begrenzt zu sein, Monosaccharide wie beispielsweise Glucose und Fructose, Oligosaccharide wie beispielsweise Lactose oder Saccharose, Polysaccharide wie beispielsweise Stärke oder Cellulose oder Gemische davon und ungereinigte Gemische aus erneuerbaren Ausgangsmaterialien, wie beispielsweise Käsemolkepermeat, Maisquellwasser, Zuckerrübenmelassen und Gerstenmalz, gehören. Zusätzlich kann das Kohlenstoffsubstrat auch aus ein-Kohlenstoff-Substraten wie beispielsweise Kohlendioxid oder Methanol bestehen, für welche metabolische Umwandlung in biochemische Schlüsselzwischenverbindungen demonstriert worden ist. Über Glycerol-Herstellung aus ein-Kohlenstoffquellen (z.B. Methanol, Formaldehyd oder Formiat) in methylotrophen Hefen (K. Yarnada et al., *Agric. Biol. Chem.* 53 (2), 541–543 (1989)) und in Bakterien (Hunter et al., *Biochemistry* 24, 4148–4155 (1985)) ist berichtet worden. Diese Mikroorganismen können ein-Kohlenstoff-Verbindungen, die im Oxidationszustand von Methan bis Formiat reichen, assimilieren und Glycerol erzeugen. Der Weg der Kohlenstoffassimilation kann über Ribulosemonophosphat, über Serin oder über Xylulosemonophosphat gehen (Gottschalk, *Bacterial Metabolism* (Bakterieller Metabolismus), Zweite Auflage, Springer-Verlag, New York (1986)). Der Ribulosemonophosphat-Weg beinhaltet die Kondensation von Formiat mit Ribulose-5-phosphat zur Erzeugung eines 6-Kohlenstoff-Zuckers, der zu Fructose und schließlich zu dem drei-Kohlenstoffprodukt Glyceraldehyd-3-phosphat wird. Ähnlich assimiliert der Serin-Weg die ein-Kohlenstoff-Verbindung in den Glycolysegeweg über Methylentetrahydrofolat.

[0126] Zusätzlich zu ein- und zwei-Kohlenstoffsubstraten sind methylotrophe Mikroorganismen auch dafür bekannt, eine Anzahl von anderen kohlenstoffhaltigen Verbindungen wie beispielsweise Methylamin, Glucosamin und eine Vielfalt von Aminosäuren für metabolische Aktivität nutzen. Zum Beispiel ist methylotrophe Hefe dafür bekannt, den Kohlenstoff von Methylamin zu nutzen, um Trehalose oder Glycerol zu erzeugen (Bellion et al., *Microb. Growth Cl Compd.*, [Int. Symp.], 7 (1993), 415–32. Herausgeber: Murrell, J. Collin; Kelly, Don P. Herausgeber: Intercept, Andover, UK). Ähnlich metabolisieren verschiedene Spezies von *Candida* Alanin oder Oleinsäure (Sulter et al., *Arch. Microbiol.* 153 (5), 485–489 (1990)). Daher wird in Erwägung gezogen, daß die Kohlenstoffquelle, die in der vorliegenden Erfindung benutzt wird, eine breite Vielfalt von kohlenstoffhaltigen Substraten einschließen kann und nur durch die Wahl von Mikroorganismus oder Verfahren begrenzt wird.

[0127] Obwohl in Erwägung gezogen wird, daß alle von den vorstehend erwähnten Kohlenstoffsubstraten und Gemischen (gemeinsame Zuführung) davon in der vorliegenden Erfindung geeignet sind, sind bevorzugte Kohlenstoffsubstrate Glucose, Fructose, Saccharose oder Methanol, wo das Verfahren ein endogenes Glycerol erzeugen soll, und Glycerol oder Dihydroxyaceton, wo das Verfahren eine Glycerol- oder Dihydroxyaceton-zuführung erwartet.

[0128] Zusätzlich zu einer geeigneten Kohlenstoffquelle müssen Fermentationsmedien geeignete Mineralien, Salze, Co-Faktoren, Puffer und andere dem Fachmann bekannte Komponenten enthalten, die für das Wachstum der Kulturen und die Förderung des enzymatischen Weges, notwendig für die 1,3-Propandiol-Herstellung, geeignet sind. Besondere Aufmerksamkeit wird Co(II)-Salzen und/oder Vitamin B₁₂ oder Vorstufen davon gegeben.

[0129] Adenosyl-Cobalamin (Coenzym B₁₂) ist ein essentieller Cofaktor für Dehydratase-Aktivität. Synthese von Coenzym B₁₂ wird in Prokaryoten gefunden, von denen einige imstande sind, die Verbindung de novo zu synthetisieren, zum Beispiel *Escherichia blattae*, *Klebsiella*-Spezies, *Citrobacter*-Spezies und *Clostridium*-Spezies, während andere teilweise Reaktionen durchführen können. *E. coli* kann zum Beispiel die Corrin-Ringstruktur nicht erzeugen, aber ist imstande, die Umwandlung von Cobinamid in Corrinoid zu katalysieren, und kann die 5'-Desoxyadenosylgruppe einführen. So ist auf dem Fachgebiet bekannt, daß eine Coenzym-B₁₂-Vorstufe, wie beispielsweise Vitamin B₁₂, in *E.-coli*-Fermentationen bereitgestellt werden muß.

[0130] Vitamin-B₁₂-Zugaben zu *E.-coli*-Fermentationen können kontinuierlich mit einer konstanten Geschwindigkeit oder in Abschnitten, um mit der Erzeugung von Zellmasse zusammenzutreffen, hinzugegeben werden oder können in einzelnen oder mehrfachen Bolus-Zugaben hinzugegeben werden. Bevorzugte Verhältnisse von zugeführtem Vitamin B₁₂ (mg) zu Zellmasse (OD550) betragen von 0,06 bis 0,60. Am meisten bevorzugte Verhältnisse von zugeführtem Vitamin B₁₂ (mg) zu Zellmasse (OD550) betragen von 0,12 bis 0,48.

[0131] Obwohl Vitamin B₁₂ zu der transformierten *E. coli* der vorliegenden Erfindung hinzugegeben wird, wird in Erwägung gezogen, daß andere Mikroorganismen, imstande zu de-novo-B₁₂-Biosynthese, ebenfalls geeignete Produktionszellen sind und die Zugabe von B₁₂ zu diesen Mikroorganismen unnötig ist.

Kulturbedingungen:

[0132] Typischerweise werden Zellen bei 35°C in passenden Medien gezüchtet. Bevorzugte Wachstumsmedien in der vorliegenden Erfindung sind gebräuchliche kommerziell hergestellte Medien wie beispielsweise Luria-Bertani-(LB)-Nährbrühe, Sabouraud-Dextrose-(SD)-Nährbrühe oder Hefemedium-(YM)-Nährbrühe. Andere definierte oder synthetische Wachstumsmedien können ebenfalls verwendet werden und das passende Medium für Wachstum des speziellen Mikroorganismus ist dem Fachmann auf dem Gebiet von Mikrobiologie oder Fermentationswissenschaft bekannt. Die Verwendung von Mitteln, von denen bekannt ist, daß sie Katabolitrepression direkt oder indirekt modulieren, z.B. cyclisches Adenosin-2':3'-monophosphat, können ebenfalls in die Reaktionsmedien eingebracht werden. Ähnlich kann die Verwendung von Mitteln, von denen bekannt ist, daß sie enzymatische Aktivitäten modulieren (z.B. Methylviologen), die zu Erhöhung der 1,3-Propandiol-Herstellung führen, in Verbindung mit oder als Alternative zu genetischen Manipulationen verwendet werden.

[0133] Geeignete pH-Bereiche für die Fermentation liegen zwischen pH 5,0 bis pH 9,0, wo pH 6,0 bis pH 8,0 als anfängliche Bedingung bevorzugt wird.

[0134] Reaktionen können unter aeroben oder anaeroben Bedingungen durchgeführt werden, wo anaerobe oder mikroaerobe Bedingungen bevorzugt werden.

[0135] Fed-Batch-Fermentationen können mit der Kohlenstoffzuführung von zum Beispiel Glucose, begrenzt oder überschüssig, durchgeführt werden.

Chargenweise und kontinuierliche Fermentationen:

[0136] Das vorliegende Verfahren wendet ein Chargenverfahren der Fermentation an. Klassische Chargenfermentation ist ein geschlossenes System, wo die Zusammensetzung der Medien am Beginn der Fermentation eingestellt wird und während der Fermentation nicht Anlaß künstlicher Veränderungen ist. So wird am Beginn der Fermentation das Medium mit dem gewünschten Mikroorganismus oder Mikroorganismen beimpft und die Fermentation wird ablaufen gelassen, ohne etwas zu dem System hinzugeben. Typischerweise ist jedoch „Chargen“-Fermentation chargenmäßig im Hinblick auf die Zugabe der Kohlenstoffquelle, und es werden

oft Versuche beim Steuern von Faktoren wie beispielsweise pH und Sauerstoffkonzentration gemacht. In Chargensystemen ändern sich die Metabolit- und Biomassezusammensetzung des Systems konstant bis zu der Zeit, wo die Fermentation beendet wird. Innerhalb von Batch-Kulturen mäßigen sich Zellen durch eine statische lag-Phase zu einer log-Phase mit hohem Wachstum und schließlich zu einer stationären Phase, wo die Wachstumsgeschwindigkeit vermindert oder angehalten ist. Wenn unbehandelt, werden Zellen in der stationären Phase schließlich sterben. Zellen in der log-Phase sind im allgemeinen für die Hauptmenge der Produktion des Endprodukts oder der Zwischenverbindung verantwortlich.

[0137] Eine Variation des Standardchargensystems ist das Fed-Batch-System. Fed-Batch-Fermentationsverfahren sind auch in der vorliegenden Erfindung geeignet und umfassen ein typisches Chargensystem mit der Ausnahme, daß das Substrat in Inkrementen hinzugegeben wird, während die Fermentation voranschreitet. Fed-Batch-Systeme sind nützlich, wenn Katabolitrepession dazu neigt, den Metabolismus der Zellen zu hemmen, und wo es wünschenswert ist, begrenzte Mengen von Substrat in den Medien zu haben. Messung der tatsächlichen Substratkonzentration in Fed-Batch-Systemen ist schwierig und wird daher auf der Basis der Änderungen meßbarer Faktoren, wie beispielsweise pH, gelöster Sauerstoff und der Partialdruck von Abfallgasen wie beispielsweise CO₂, geschätzt. Chargen- und Fed-Batch-Fermentationen sind gebräuchlich und auf dem Fachgebiet bekannt und Beispiele können bei Brock, vorstehend, gefunden werden.

[0138] Obwohl die vorliegende Erfindung im Chargenmodus durchgeführt wird, wird damit gerechnet, daß das Verfahren an kontinuierliche Fermentationsverfahren anpaßbar sein würde. Kontinuierliche Fermentation ist ein offenes System, wo ein definiertes Fermentationsmedium kontinuierlich in einen Bioreaktor gegeben wird und eine gleiche Menge von konditioniertem Medium gleichzeitig zur Verarbeitung entfernt wird. Kontinuierliche Fermentation hält im allgemeinen die Kulturen bei einer konstanten hohen Dichte, wo Zellen in erster Linie in der log-Phase des Wachstums sind.

[0139] Kontinuierliche Fermentation erlaubt die Abstimmung eines Faktors oder einer Anzahl von Faktoren, die Zellwachstum oder Endproduktkonzentration beeinflussen. Zum Beispiel hält eine Methode einen begrenzenden Nährstoff, wie beispielsweise die Kohlenstoffquelle oder das Stickstoffniveau, bei einer festgelegten Rate und erlaubt allen anderen Parametern nachzulassen. In anderen Systemen kann eine Anzahl von Faktoren, die das Wachstum beeinflussen, kontinuierlich verändert werden, während die Zellkonzentration, gemessen durch die Trübung des Mediums, konstant gehalten wird. Kontinuierliche Systeme sind bestrebt, die Wachstumsbedingungen des stationären Zustands aufrecht zu erhalten, und so muß der Zellverlust, zurückzuführen auf das Medium, das abgezogen wird, gegen die Zellwachstumsrate in der Fermentation ausgeglichen werden. Methoden der Abstimmung von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren für kontinuierliche Fermentationsverfahren ebenso wie Techniken zur Maximierung der Rate der Produkterzeugung sind auf dem Fachgebiet der industriellen Mikrobiologie bekannt und eine Vielfalt von Verfahren ist ausführlich von Brock, vorstehend, dargestellt.

[0140] Es wird damit gerechnet, daß die vorliegende Erfindung praktisch unter Verwendung von Chargen, Fed-Batch- oder kontinuierlichen Verfahren ausgeführt werden kann und daß jeder bekannte Fermentationsmodus geeignet sein würde. Zusätzlich wird damit gerechnet, daß Zellen auf einem Substrat als Ganzzellenkatalysatoren immobilisiert und Fermentationsbedingungen für 1,3-Propandiol-Herstellung unterworfen werden können.

Identifizierung und Reinigung von 1,3-Propandiol:

[0141] Verfahren für die Reinigung von 1,3-Propandiol aus Fermentationsmedien sind auf dem Fachgebiet bekannt. Zum Beispiel können Propandiole aus Zellmedien erhalten werden, indem das Reaktionsgemisch der Extraktion mit einem organischen Lösungsmittel, Destillation und Säulenchromatographie unterworfen wird (US-5356812). Ein besonders gutes organisches Lösungsmittel für dieses Verfahren ist Cyclohexan (US-5008473).

[0142] 1,3-Propandiol kann direkt identifiziert werden, indem die Medien Hochdruckflüssigkeitschromatographie-(HPLC)-Analyse unterworfen werden. Bevorzugt in der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren, wo Fermentationsmedium auf einer analytischen Ionenaustauschersäule unter Verwendung einer mobilen Phase von 0,01 N Schwefelsäure in einer isokratischen Weise analysiert wird.

BEISPIELE

ALLGEMEINE VERFAHREN

[0143] Verfahrensweisen für Phosphorylierungen, Ligierungen und Transformationen sind auf dem Fachgebiet bekannt. Techniken, geeignet zur Verwendung in den folgenden Beispielen, können bei Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Molekulares Klonieren: Ein Laborhandbuch)*, Zweite Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), gefunden werden.

[0144] Materialien und Methoden, die zur Aufrechterhaltung und Aufzucht von Bakterienkulturen geeignet sind, sind auf dem Fachgebiet bekannt. Techniken, die zur Verwendung in den folgenden Beispielen geeignet sind, können in *Manual of Methods for General Bacteriology (Handbuch von Methoden für allgemeine Bakteriologie)* (Phillipp Gerhardt, R. G. E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg und G. Briggs Phillips, Hrsg.), American Society for Microbiology, Washington, DC (1994) oder Thomas D. Brock in *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology (Biotechnologier: Ein Lehrbuch der industriellen Mikrobiologie)*, Zweite Auflage (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, gefunden werden. Alle zur Aufzucht und Aufrechterhaltung von Bakterienzellen verwendeten Reagenzien und Materialien wurden von Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI), DIFCO Laboratories (Detroit, MI), GIBCO/BRL (Gaithersburg, MD) oder Sigma Chemical Company (St. Louis, MO) erhalten, wenn nicht anderweitig festgelegt.

[0145] Die Bedeutung von Abkürzungen ist wie folgt: „h“ bedeutet Stunde(n), „min“ bedeutet Minute(n), „s“ bedeutet Sekunde(n), „d“ bedeutet Tag(e), „ml“ bedeutet Milliliter, „l“ bedeutet Liter, 50 amp sind 50 µg/ml Ampicillin und LB-50 amp ist Luria-Bertani-Brühe, die 50 µg/ml Ampicillin enthält.

[0146] Innerhalb der Tabellen werden die folgenden Abkürzungen verwendet. „Con.“ ist „conversion“ (Umwandlung), „Sel.“ ist „selectivity“ (Selektivität), bezogen auf Kohlenstoff, und „nd“ ist „not detected“ nicht nachgewiesen.

[0147] Stämme und Vektoren, die in den folgenden Beispielen verwendet und konstruiert werden, sind in der nachstehenden Übersichtstabelle aufgeführt:

Stamm/Plasmid	Deletion	ORF/Gen
KLP23	<i>gldA</i> <i>glpK</i>	
RJ8m	<i>gldA</i> <i>glpK</i> <i>Tpi</i>	
pAH48		GPP2 DAR1
pDT29		<i>dhaR</i> <i>orfY</i> <i>dhaT</i> <i>orfX</i> <i>orfW</i> <i>dhaB1</i> <i>dhaB2</i> <i>dhaB3</i> <i>orfZ</i>
pKP32		<i>dhaR</i> <i>orfY</i> <i>orfX</i> <i>orfW</i> <i>dhaB1</i> <i>dhaB2</i> <i>dhaB3</i> <i>orfZ</i>

ENZYMASSAYS

Assays für Dehydratase-Enzyme:

[0148] Dehydratase-Aktivität in zellfreien Extrakten wurde unter Verwendung von entweder Glycerol oder 1,2-Propandiol als Substrat bestimmt. Typischerweise wurden zellfreie Extrakte durch Zellerstörung unter Verwendung einer French-Press und nachfolgende Zentrifugation der Zelldebris hergestellt. Der Assay, basierend auf der Umsetzung von Aldehyden mit Methylbenzo-2-thiazolonhydraxon, ist von Forage und Foster beschrieben worden (Biochim. Biophys. Acta 569, 249 (1979)).

[0149] Honda et al. (J. Bacteriol. 143, 1458 (1980)) offenbaren einen Assay, der die Reaktivierung von Dehydratasen mißt. Dehydratase-Aktivität wurde in toluolisierten ganzen Zellen, mit und ohne ATP, unter Verwendung von entweder Glycerol oder 1,2-Propandiol als Substrat bestimmt. Reaktivierung wurde durch das Verhältnis von Produktbildung mit im Verhältnis zu der ohne die ATP-Zugabe bestimmt. Produktbildung (3-HPA oder Propionaldehyd, wenn Glycerol bzw. 1,2-Propandiol als Substrat verwendet wird) wurde direkt unter Verwendung von HPLC oder indirekt unter Verwendung von Methylbenzo-2-thiazolonhydraxon-Reagenz gemessen. Alternativ wurde Produktbildung durch Koppeln der Umwandlung des Aldehyds zu seinem jeweiligen Alkohol unter Verwendung einer NADH-verknüpften Alkohol-Dehydrogenase und Überwachen des Verschwindens von NADH bestimmt.

Assays für 1,3-Propandiol-Oxidoreductase:

[0150] Die Aktivität von 1,3-Propandiol-Oxidoreductase, manchmal als 1,3-Propandiol-Dehydrogenase bezeichnet, wurde für zellfreie Extrakte in Lösung oder in Gelplatten unter Verwendung von 1,3-Propandiol und NAD⁺ als Substraten bestimmt, sie wurde beschrieben (Johnson und Lin, J. Bacteriol. 169, 2050 (1987)). Alternativ wurde die Umwandlung von 3-HPA und NADH in 1,3-Propandiol und NAD⁺ durch das Verschwinden von NADH bestimmt. Der Gelplattenassay hat den potentiellen Vorteil, die Aktivität von 1,3-Propandiol-Oxidoreductase (*dhaT*) von der von nicht-spezifischen Alkohol-Dehydrogenasen vermöge der Größentrennung zu trennen. Die nativen Molekulargewichte von 1,3-Propandiol-Oxidoreductasen (*dhaT*) von *Citrobacter freundii*,

Klebsiella pneumoniae und *Clostridium pasteurianum* sind ungewöhnlich groß, in der Größenordnung von 330000 bis 440000 Dalton. *Lactobacillus brevis* und *Lactobacillus buchneri* enthalten Dehydratase-assoziierte 1,3-Propandiol-Oxidoreductasen mit Eigenschaften ähnlich denjenigen von bekannten 1,3-Propandiol-Oxidoreductasen (dhaT).

Assays für Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität:

[0151] Eine Verfahrensweise wurde verwendet, wie sie nachstehend aus einem Verfahren, veröffentlicht von Bell et al. (J. Biol. Chem. 250, 7153 (1975)), modifiziert wurde. Dieses Verfahren beinhaltet das Inkubieren einer Probe eines zellfreien Extrakts in einer Küvette, die 0,2 mM NADH, 2,0 mM Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Enzym in 0,1 M Tris/HCl, pH-7,5-Puffer mit 5 mM DTT, in einem Gesamtvolumen von 1,0 ml bei 30°C enthielt. Eine Hintergrundgeschwindigkeit der Reaktion von Enzym und NADH wurde zuerst bei 340 nm für mindestens 3 min bestimmt. Das zweite Substrat, DHAP, wurde nachfolgend hinzugegeben und die Änderung der Extinktion mit der Zeit wurde weiter für mindestens 3 min überwacht. G3PDH-Aktivität wurde durch Abziehen der Hintergrundgeschwindigkeit von der Bruttogeschwindigkeit definiert.

Assay für Glycerol-3-Phosphatase-Aktivität:

[0152] Der Assay für Enzymaktivität wurde durch Inkubieren des Extrakts mit einem Substrat eines organischen Phosphats in einem bis-Tris oder MES und Magnesiumpuffer, pH 6,5, durchgeführt. Das verwendete Substrat war entweder 1- α -Glycerolphosphat oder d,l- α -Glycerolphosphat. Die finalen Konzentrationen der Reagenzien in dem Assay sind: Puffer (20 mM, bis-Tris oder 50 mM MES); MgCl₂ (10 mM) und Substrat (20 mM). Wenn das Gesamtprotein in der Probe gering war und keine sichtbare Ausfällung bei einem Abschrecken mit Säure erfolgt, wurde die Probe bequemerweise in der Kuvette geprüft. Dieses Verfahren beinhaltet das Inkubieren einer Enzymprobe in einer Küvette, die 20 mM Substrat (50 μ l, 200 mM), 50 mM MES, 10 mM MgCl₂, pH-6,5-Puffer enthielt. Das Volumen des finalen Phosphatase-Assays betrug 0,5 ml. Die Enzym enthaltende Probe wurde zu dem Reaktionsgemisch gegeben; der Inhalt der Küvette wurde gemischt und dann wurde die Küvette in einem Umlaufwasserbad bei T = 37°C für 5 bis 120 min plaziert, wobei die Länge der Zeit davon abhing, ob die Phosphatase-Aktivität in der Enzymprobe von 2 bis 0,02 U/ml reichte. Die enzymatische Reaktion wurde durch die Zugabe des Säure-Molybdat-Reagenzes (0,4 ml) abgeschreckt. Nachdem das Fiske-SubbaRow-Reagenz (0,1 ml) und destilliertes Wasser (1,5 ml) hinzugegeben worden waren, wurde die Lösung gemischt und sich entwickeln gelassen. Nach 10 min, um volle Farbentwicklung zu erlauben, wurde die Extinktion der Proben bei 660 nm unter Verwendung eines UV/Vis-Spektrophotometers Cary 219 abgelesen. Die Menge von freigesetztem anorganischen Phosphat wurde mit einer Standardkurve verglichen, die durch Verwenden einer Stammlösung von anorganischem Phosphat (0,65 mM) und Herstellen von 6 Standards mit finalen Konzentrationen von anorganischem Phosphat, die von 0,026 bis 0,130 μ mol/ml reichten, hergestellt wurde.

Assay für Glycerol-Kinase-Aktivität

[0153] Eine geeignete Menge von Enzym, typischerweise ein zellfreier Rohextrakt, wurde zu einem Reaktionsgemisch, enthaltend 40 mM ATP, 20 mM MgSO₄, 21 mM gleichmäßig ¹³C-markiertes Glycerol (99%, Cambridge Isotope Laboratories) und 0,1 M Tris-HCl, pH 9, für 75 min bei 25°C hinzugegeben. Die Umwandlung von Glycerol in Glycerol-3-phosphat wurde durch ¹³C-NMR (125 MHz) nachgewiesen: Glycerol (63,11 ppm, δ , J = 41 Hz und 72,66 ppm, t, J = 41 Hz); Glycerol-3-phosphat (62,93 ppm, δ , J = 41 Hz; 65,31 ppm, br d, J = 43 Hz; und 72,66 ppm, dt, J = 6, 41 Hz).

Assay von NADH-verknüpfter Glycerol-Dehydrogenase:

[0154] Die Aktivität von NADH-verknüpfter Glycerol-Dehydrogenase (gldA) in zellfreien Extrakten von *E. coli*-Stämmen wurde nach Proteintrennung durch nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt. Die Umwandlung von Glycerol plus NAD⁺ in Dihydroxyaceton plus NADH wurde mit der Umwandlung von 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu einem tief gefärbten Formazan unter Verwendung von Phenazinmethosulfat (PMS) als Vermittler gekoppelt (Tang et al., J. Bacteriol. 140, 182 (1997)).

[0155] Elektrophorese wurde in doppelter Ausführung durch Standardverfahrensweisen unter Verwendung von nativen Gelen (8–16% TG, 1,5 mm, Gele mit 15 Bahnen von Novex, San Diego, CA) durchgeführt. Restliches Glycerol wurde von den Gelen durch 3 \times Waschen mit 50 mM Tris oder Kaliumcarbonatpuffer, pH 9, für 10 Minuten entfernt. Die doppelten Gele wurden, mit und ohne Glycerol (ungefähr 0,16 M finale Konzentration), in 15 ml von Assaylösung, enthaltend 50 mM Tris oder Kaliumcarbonat, pH 9, 60 mg Ammoniumsulfat, 75 mg

NAD⁺, 1,5 mg MTT und 0,5 mg PMS, entwickelt.

[0156] Die Anwesenheit oder Abwesenheit von NADH-verknüpfter Glycerol-Dehydrogenase-Aktivität in *E.-coli*-Stämmen (*gldA*) wurde nach Polyacrylamid-Gelelektrophorese durch Umsetzung mit polyklonalen Antikörpern, gerichtet gegen gereinigte *K.-pneumoniae*-Glycerol-Dehydrogenase (*dhaD*), ebenfalls bestimmt.

Isolierung und Identifizierung von 1,3-Propandiol

[0157] Die Umwandlung von Glycerol in 1,3-Propandiol wurde durch HPLC überwacht. Analysen wurden unter Verwendung von Standardtechniken und -materialien, verfügbar für den Fachmann auf dem Gebiet der Chromatographie, durchgeführt. Ein geeignetes Verfahren benutzte ein HPLC-System Waters Maxima 820 unter Verwendung von UV- (210 nm) und RI-Nachweis. Proben wurden auf eine Säule Shodex SH-1011 (8 mm × 300 mm, gekauft von Waters, Milford, MA), ausgestattet mit einer Vorsäule Shodex SH-1011P (6 mm × 50 mm), Temperatur-kontrolliert bei 50°C unter Verwendung von 0,01 N H₂SO₄ als mobile Phase mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min, injiziert. Wenn quantitative Analyse gewünscht wurde, wurden Proben mit einer bekannten Menge von Trimethyllessigsäure als externem Standard hergestellt. Typischerweise waren die Retentionszeiten von Glucose (RI-Nachweis), Glycerol, 1,3-Propandiol (RI-Nachweis) und Trimethyllessigsäure (UV- und RI-Nachweis) 15,27 min, 20,67 min, 26,08 min bzw. 35,03 min.

[0158] Die Herstellung von 1,3-Propandiol wurde durch GC/MS bestätigt. Analysen wurden unter Verwendung von Standardtechniken und -materialien, verfügbar für den Fachmann auf dem Gebiet von GC/MS, durchgeführt. Ein geeignetes Verfahren benutzte einen Gaschromatograph Hewlett Packard 5890 Serie II, gekoppelt mit einem Masse-selektiven Detektor Hewlett Packard 5971 Serie (EI) und einer HP-INNOWax-Säule (30 m Länge, 0,25 mm innerer Durchmesser, 0,25 Mikrometer Filmdicke). Die Retentionszeit und das Massenspektrum von erzeugtem 1,3-Propandiol wurden mit denen von authentischem 1,3-Propandiol (m/e: 57, 58) verglichen.

[0159] Ein alternatives Verfahren für GC/MS beinhaltete Derivatisierung der Probe. Zu 1,0 ml Probe (z.B. Kulturüberstand) wurden 30 µl konzentrierte (70% Vol./Vol.) Perchlorsäure hinzugegeben. Nach dem Mischen wurde die Probe gefroren und lyophilisiert. Ein 1:1-Gemisch von Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid:Pyridin (300 µl) wurde zu dem lyophilisierten Material hinzugegeben, heftig gemischt und für eine h bei 65°C plaziert. Die Probe wurde durch Zentrifugation von unlöslichem Material geklärt. Die resultierende Flüssigkeit verteilte sich in zwei Phasen, von denen die obere für die Analyse verwendet wurde. Die Probe wurde auf einer DB-5-Säule (48 m, 0,25 mm innerer Durchmesser, 0,25 µm Filmdicke; von J & W Scientific) chromatographiert und die Retentionszeit und das Massenspektrum des 1,3-Propandiolderivats, erhalten aus Kulturüberständen, wurden mit denen, erhalten von authentischen Standards, verglichen. Die Massenspektren von TMS-derivatisiertem 1,3-Propandiol enthält die charakteristischen Ionen von 205, 177, 130 und 115 AMU.

Zell-Lyse:

[0160] Die Zell-Lyse wurde durch Messen der Konzentration von extrazellulärem löslichen Protein in der Fermentationsbrühe abgeschätzt. Fermenterproben wurden in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (typischerweise 3–5 min mit 12000 U/min in einer Mikrozentrifuge Eppendorf Modell 5415C), um die Zellen zu trennen. Der resultierende Überstand wurde auf die Proteinkonzentration durch das Bradford-Verfahren unter Verwendung eines im Handel erhältlichen Reagenzes (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, Hercules, CA) analysiert.

Lebensfähigkeit:

[0161] Die Zell-Lebensfähigkeit wurde durch Plattieren mit geeigneten Verdünnungen von aus dem Fermenter erhaltenen Zellen auf nicht-selektiven LB-Agarplatten bestimmt. Die Zell-Lebensfähigkeit zwischen Fermenterexperimenten wird unter Verwendung des Verhältnisses von lebensfähigen Zellen pro ml Fermenterbrühe, dividiert durch OD550 (AU), verglichen.

BEISPIEL 1

KLONIERUNG UND TRANSFORMATION VON E.-COLI-WIRTSZELLEN MIT COSMID-DNA FÜR DIE EXPRESSION VON 1,3-PROPANDIOL

Medien:

[0162] Synthetisches S12-Medium wurde beim Screening von bakteriellen Transformanten für die Fähigkeit zur Herstellung von 1,3-Propandiol verwendet. S12-Medium enthält: 10 mM Ammoniumsulfat, 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, 2 mM MgCl₂, 0,7 mM CaCl₂, 50 µM MnCl₂, 1 µM FeCl₃, 1 µM ZnCl, 1,7 µM CuSO₄, 2,5 µM CoCl₂, 2,4 µM Na₂MoO₄ und 2 µM Thiaminhydrochlorid.

[0163] Medium A, verwendet für Aufzucht und Fermentation, bestand aus: 10 mM Ammoniumsulfat; 50 mM MOPS/KOH-Puffer, pH 7,5; 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5; 2 mM MgCl₂; 0,7 mM CaCl₂; 50 µM MnCl₂; 1 µM FeCl₃; 1 µM ZnCl; 1,72 µM CuSO₄; 2,53 µM CoCl₂; 2,42 µM Na₂MoO₄; 2 µM Thiaminhydrochlorid; 0,01% Hefeextrakt; 0,01% Casaminosäuren; 0,8 µg/ml Vitamin B₁₂; und 50 µg/ml amp. Medium A wurde mit entweder 0,2% Glycerol oder 0,2% Glycerol plus 0,2% D-Glucose wie erforderlich ergänzt.

Zellen:

[0164] *Klebsiella pneumoniae* ECL2106 (Ruch et al., J. Bacteriol. 124, 348 (1975)), ebenfalls bekannt in der Literatur als *K. aerogenes* oder *Aerobacter aerogenes*, wurde von E. C. C. Lin (Harvard Medical School, Cambridge, MA) erhalten und wurde als Laborkultur gehalten.

[0165] *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25955 wurde von der American Type Culture Collection (Manassas, VA) gekauft.

[0166] *E. coli* DH5α wurde von Gibco/BRL gekauft und wurde mit der Cosmid-DNA, isoliert aus *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25955, enthaltend ein Gen, codierend für entweder ein Glycerol- oder ein Diol-Dehydratase-Enzym, transformiert. Cosmide, enthaltend die Glycerol-Dehydratase, wurden als pKP1 und pKP2 identifiziert, und Cosmid, enthaltend das Diol-Dehydratase-Enzym, wurde als pKP4 identifiziert. Transformierte DH5α-Zellen wurden als DH5α-pKP1, DH5α-pKP2 und DH5α-pKP4 identifiziert.

[0167] *E. coli* ECL707 (Sprenger et al., J. Gen. Microbiol. 135, 1255 (1989)) wurde von E. C. C. Lin (Harvard Medical School, Cambridge, MA) erhalten und wurde ähnlich mit Cosmid-DNA aus *Klebsiella pneumoniae* transformiert. Diese Transformanten wurden als ECL707-pKP1 und ECL707-pKP2, enthaltend das Glycerol-Dehydratase-Gen, und ECL707 pKP4, enthaltend das Diol-Dehydratase-Gen, identifiziert.

[0168] *E. coli* AA200, enthaltend eine Mutation in dem *tpi*-Gen (Anderson et al., J. Gen. Microbiol. 62, 329 (1970)), wurde von dem *E. coli* Genetic Stock Center, Yale University (New Haven, CT) gekauft und wurde mit *Klebsiella*-Cosmid-DNA transformiert, wobei sich die rekombinanten Mikroorganismen AA200-pKP1 und AA200-pKP2, enthaltend das Glycerol-Dehydratase-Gen, und AA200-pKP4, enthaltend das Diol-Dehydratase-Gen, ergaben.

DH5α:

[0169] Sechs Transformationsplatten, enthaltend ungefähr 1000 Kolonien von *E. coli* XL1-Blue MR, transfiziert mit *K. pneumoniae*-DNA, wurden mit 5 ml LB-Medium gewaschen und zentrifugiert. Die Bakterien wurden pelletisiert und in 5 ml LB-Medium + Glycerol resuspendiert. Ein Aliquot (50 µl) wurde in ein 15-ml-Röhrchen, enthaltend synthetisches Medium S12 mit 0,2% Glycerol und 400 ng pro ml Vitamin B₁₂ + 0,001% Hefeextrakt + 50 amp, eingepflegt. Das Röhrchen wurde mit dem Medium bis oben gefüllt und mit Parafilm eingewickelt und bei 30°C inkubiert. Eine leichte Trübung wurde nach 48 h beobachtet. Aliquots, analysiert für Produktverteilung wie vorstehend beschrieben nach 78 h und 132 h, waren für 1,3-Propandiol positiv, wobei die letzteren Zeitpunkte erhöhte Mengen von 1,3-Propandiol enthielten.

[0170] Die Bakterien, die positiv für 1,3-Propandiol-Herstellung getestet wurden, wurden seriell verdünnt und auf LB-50-amp-Platten plattiert, um einzelne Kolonien zu isolieren. Achtundvierzig einzelne Kolonien wurden isoliert und wieder auf die Herstellung von 1,3-Propandiol geprüft. Cosmid-DNA wurde aus 6 unabhängigen Klonen isoliert und in den *E. coli*-Stamm DH5α transformiert. Die Transformanten wurden wieder auf die Herstellung von 1,3-Propandiol geprüft. Zwei Transformanten wurden weiter charakterisiert und als DH5α-pKP1

und DH5 α -pKP2 bezeichnet.

[0171] Ein 12,1-kb-EcoRI-Sall-Fragment von pKP1, subkloniert in pIBI31 (IBI Biosystem, New Haven, CT) wurde sequenziert und als pHK28-26 (SEQ ID NO:1) bezeichnet. Sequenzierung enthüllte die Orte der relevanten offenen Leserahmen des dha-Operons, codierend Glycerol-Dehydratase, und zur Regulation notwendige Gene. Bezugnehmend auf SEQ ID NO:1 wird ein Fragment des offenen Leserahmens für dhaK1, codierend Dihydroxyaceton-Kinase, an den Basen 1–399 gefunden (Komplement); der offene Leserahmen dhaD, codierend Glycerol-Dehydrogenase, wird an den Basen 1010–2107 gefunden; der offene Leserahmen dhaR, codierend den Repressor, wird an den Basen 2209–4134 gefunden; der offene Leserahmen orfW, codierend ein Protein unbekannter Funktion, wird an den Basen 4112–4642 gefunden (Komplement); der offene Leserahmen orfX, codierend ein Dehydratase-Reaktivierungsprotein, wird an den Basen 4643–4696 gefunden (Komplement); der offene Leserahmen dhaT, codierend 1,3-Propandiol-Oxidoreductase, wird an den Basen 5017–6180 gefunden (Komplement); der offene Leserahmen orfY, codierend ein Protein unbekannter Funktion, wird an den Basen 6202630 gefunden (Komplement); der offene Leserahmen dhaB1, codierend die alpha-Untereinheit-Glycerol-Dehydratase, wird an den Basen 7044–8711 gefunden; der offene Leserahmen dhaB2, codierend die beta-Untereinheit-Glycerol-Dehydratase, wird an den Basen 8724–9308 gefunden; der offene Leserahmen dhaB3, codierend die gamma-Untereinheit-Glycerol-Dehydratase wird an den Basen 9311–9736 gefunden; der offene Leserahmen dhaBX codierend ein Dehydratase-Reaktivierungsprotein, wird an den Basen 9749–11572 gefunden; und ein Fragment des offenen Leserahmens für glpF, codierend ein Glycerolaufnahme-Facilitator-Protein, wird an den Basen 11626–12145 gefunden.

[0172] Einzelne Kolonien von *E. coli* XL1-Blue MR, transfiziert mit verpackter Cosmid-DNA aus *K. pneumoniae*, wurden in Mikrotiter-Vertiefungen, enthaltend 200 μ l S15-Medium (Ammoniumsulfat, 10 mM; Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, 1 mM; MOPS/KOH-Puffer, pH 7,0, 50 mM; MgCl₂, 2 mM; CaCl₂, 0,7 mM; MnCl₂, 50 μ M; FeCl₃, 1 μ M; ZnCl₂, 1 μ M; CuSO₄, 1,72 μ M; CoCl₂, 2,53 μ M; Na₂MoO₄, 2,42 μ M; und Thiaminhydrochlorid, 2 μ M) + 0,2% Glycerol + 400 ng/ml Vitamin B₁₂ + 0,001% Hefeextrakt + 50 μ g/ml Ampicillin, eingimpft. Zusätzlich zu den Mikrotitervertiefungen wurde eine Master-Platte, enthaltend LB-50 amp, ebenfalls beimpft. Nach 96 h wurden 100 μ l abgezogen und in einem Rainin-Mikrofugenröhrchen, enthaltend ein 0,2-Mikrometer-Nylon-Membranfilter, zentrifugiert. Bakterien wurden zurückgehalten und das Filtrat wurde zur HPLC-Analyse verarbeitet. Positive Klone, die 1,3-Propandiol-Herstellung demonstrierten, wurden nach dem Screening von ungefähr 240 Kolonien identifiziert. Drei positive Klone wurden identifiziert, von denen zwei auf LB-50 amp gewachsen waren und einer von diesen nicht. Eine einzelne Kolonie, isoliert aus einem der zwei positiven Klone, gewachsen auf LB-50 amp und verifiziert für die Herstellung von 1,3-Propandiol, wurde als pKP4 bezeichnet. Cosmid-DNA wurde aus *E. coli*-Stämmen, enthaltend pKP4, isoliert und der *E. coli*-Stamm DH5 α wurde transformiert. Ein unabhängiger Transformant, bezeichnet als DH5 α -pKP4, wurde für die Herstellung von 1,3-Propandiol verifiziert.

ECL707:

[0173] Der *E. coli*-Stamm ECL707 wurde mit Cosmid-K.-*pneumoniae*-DNA entsprechend einem von pKP1, pKP2, pKP4 oder dem Supercos-Vektor allein transformiert und ECL707-pKP1, ECL707-pKP2, ECL707-pKP4 bzw. ECL707-sc genannt. ECL707 ist fehlerhaft in glpK, gld und ptsD, welche die ATP-abhängige Glycerol-Kinase, NAD⁺-verknüpfte Glycerol-Dehydrogenase bzw. Enzym II für Dihydroxyaceton des Phosphoenolpyruvat-abhängigen Phosphotransferase-Systems codieren.

[0174] Zwanzig einzelne Kolonien von jeder Cosmid-Transformation und fünf von der Transformation mit dem Supercos-Vektors allein (negative Kontrolle), isoliert aus LB-50-amp-Platten, wurden auf eine Master-LB-50-amp-Platte überführt. Diese Isolate wurden auch auf ihre Fähigkeit getestet, Glycerol in 1,3-Propandiol umzuwandeln, um zu bestimmen, ob sie Dehydratase-Aktivität enthielten. Die Transformanten wurden mit einem sterilen Zahnstocher auf Mikrotiterplatten überführt, die 200 μ l von Medium A, ergänzt mit entweder 0,2% Glycerol oder 0,2% Glycerol plus 0,2% D-Glucose, enthielten. Nach Inkubation für 48 h bei 30°C wurde der Inhalt der Mikrotiterplattenvertiefungen durch ein 0,45-Mikrometer-Nylonfilter filtriert und durch HPLC chromatographiert. Die Ergebnisse dieser Tests sind in Tabelle 2 angegeben.

TABELLE 2

Umwandlung von Glycerol in 1,3-Propandiol durch transformierte ECL707

Transformant	Glycerol*	Glycerol plus Glucose*
ECL707-pKP1	19/20	19/20
ECL707-pKP2	18/20	20/20
ECL707-pKP4	0/20	20/20
ECL707-sc	0/5	0/5

* (Anzahl von positiven Isolaten/Anzahl von getesteten Isolaten)

AA200:

[0175] Der E.-coli Stamm AA200 wurde mit Cosmid-K.-pneumoniae-DNA entsprechend einem von pKP1, pKP2, pKP4 und dem Supercos-Vektor allein transformiert und AA200-pKP1, AA200-pKP2, AA200-pKP4 bzw. AA200-sc genannt. Der Stamm AA200 ist fehlerhaft in der Triosephosphat-Isomerase (tpi).

[0176] Zwanzig einzelne Kolonien von jeder Cosmid-Transformation und fünf von der Transformation des leeren Vektors wurden isoliert und auf ihre Fähigkeit getestet, Glycerol in 1,3-Propandiol umzuwandeln, wie für den E.-coli-Stamm ECL707 beschrieben wurde. Die Ergebnisse dieser Tests sind in Tabelle 3 angegeben.

TABELLE 3

Umwandlung von Glycerol in 1,3-Glycerol durch transformierte AA200

Transformant	Glycerol*	Glycerol plus Glucose*
AA200-pKP1	17/20	17/20
AA200-pKP2	17/20	17/20
AA200-pKP4	2/20	16/20
AA200-sc	0/5	0/5

* (Anzahl von positiven Isolaten/Anzahl von getesteten Isolaten)

BEISPIEL 2

VERARBEITUNG VON GLYCEROL-KINASE-MUTANTEN VON E. COLI FM5 ZUR HERSTELLUNG VON GLYCEROL AUS GLUCOSE

Konstruktion von Integrationsplasmid für Glycerol-Kinase-Genersetzung in E. coli FM5:

[0177] Genomische DNA von E. coli FM5 (ATCC 53911) wurde unter Verwendung des Puregene DNA Isolation Kit (Gentra Systems, Minneapolis, MN) hergestellt. Ein 1,0-kb-DNA-Fragment, enthaltend teilweise glpF- und Glycerol-Kinase-(glpK)-Gene, wurde durch PCR (Mullis und Faloona, Methods Enzymol. 155, 335 (1987)) von FM5-genomischer DNA unter Verwendung der Primer SEQ ID NO:2 und SEQ ID NO:3 amplifiziert. Ein 1,1-kb-DNA-Fragment, enthaltend teilweise glpK- und glpX-Gene, wurde durch PCR aus FM5-genomischer DNA unter Verwendung der Primer SEQ ID NO:4 und SEQ ID NO:5 amplifiziert. Eine MunI-Stelle wurde in den Primer SEQ ID NO:4 eingebracht. Das 5'-Ende des Primers SEQ ID NO:4 war das reverse Komplement des Primers SEQ ID NO:3, um nachfolgende Überlappungsextensions-PCR zu ermöglichen. Das Gen-Splicing durch Überlappungsextensions-Technik (Horton et al., BioTechniques 8, 528 (1990)) wurde verwendet, um durch PCR unter Verwendung der vorstehenden zwei PCR-Fragmente als Template und der Primer SEQ ID NO:2 und SEQ ID NO:5 ein 2,1-kb-Fragment zu erzeugen. Dieses Fragment stellte eine Deletion von 0,8 kb von der zentralen Region des 1,5-kb-glpK-Gens dar. Insgesamt hatte dieses Fragment flankierende Regionen von 1,0 kb und 1,1 kb auf jeder Seite der MunI-Klonierungsstelle (innerhalb des teilweisen glpK), um chromosomale Genersetzung durch homologe Rekombination zu erlauben.

[0178] Das vorstehende 2,1-kb-PCR-Fragment wurde mit glatten Enden versehen (unter Verwendung von

Mungobohnen-Nuclease) und unter Verwendung des Zero Blunt PCR Cloning Kit (Invitrogen, San Diego, CA) in den pCR-Blunt-Vektor kloniert, um das 5,6-kb-Plasmid pRN100, enthaltend Kanamycin- und Zeocin-Resistenzgene, zu ergeben. Das 1,2-kb-HincII-Fragment aus pLoxCat1 (unveröffentlichte Ergebnisse), enthaltend ein Chloramphenicol-ResistenzGen, flankiert von Bakteriophagen-P1-loxP-Stellen (Snaith et al., Gene 166, 173 (1995)), wurde verwendet, um das glpK-Fragment in Plasmid pRN100 zu unterbrechen indem es mit Mu-nI-digestiertem (und mit glatten Enden versehenem) Plasmid pRN100 ligiert wird, um das 6,9-kb-Plasmid pRN101-1 zu ergeben. Ein 376-bp-Fragment, enthaltend den R6K-Ursprung, wurde unter Verwendung der Primer SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:7 durch PCR aus dem Vektor pGP704 (Miller und Mekalanos, J. Bacteriol. 170, 2575–2583 (1988)) amplifiziert, mit glatten Enden versehen und mit dem 5,3-kb-Asp718-AatII-Fragment (welches mit glatten Enden versehen wurde) aus pRN101-1 ligiert, um das 5,7-kb-Plasmid pRN102-1, enthaltend Kanamycin- und Chloramphenicol-Resistenzgene, zu ergeben. Substitution der ColE1-Ursprungsregion in pRN101-1 mit dem R6K-Ursprung, um pRN102-1 zu erzeugen, beinhaltete außerdem Deletion des größten Teils des Zeocin-Resistenzgens. Der Wirt für pRN102-1-Replikation war E. coli SY327 (Miller und Mekalanos, J. Bacteriol. 170, 2575–2583 (1988)), welche das pir-Gen, notwendig für die Funktion des R6K-Ursprungs, enthält.

Bearbeitung von Glycerol-Kinase-mutantem RJF10m mit Chloramphenicol-Resistenzgen-Unterbrechung:

[0179] E. coli FM5 wurde mit dem nicht-replikativen Integrationsplasmid pRN102-1 elektrotransformiert, und Transformanten, die Chloramphenicol-resistent (12,5 µg/ml) und Kanamycin-empfindlich (30 µg/ml) waren, wurden für Glycerol-nicht-Nutzung auf M9-Minimalmedium, enthaltend 1 mM Glycerol, weiter gescreent. Ein EcoRI-Digest von genomischer DNA von einer derartigen Mutante, RJF10m, zeigte, wenn sondiert mit dem intakten glpK-Gen über Southern-Analyse (Southern, J. Mol. Biol. 98, 503–517 (1975)), an, daß es ein Doppelcrossover-Integriert (glpK-Genersetzung) war, da die zwei erwarteten Banden von 7,9 kb und 2,0 kb beobachtet wurden, zurückzuführen auf die Anwesenheit einer zusätzlichen EcoRI-Stelle innerhalb des Chloramphenicol-Resistenzgens. Die Wildtyp-Kontrolle ergab die einzelne erwartete 9,4-kb-Bande. Eine ¹³C-NMR-Analyse der Mutante RJF10m bestätigte, daß sie unfähig war, ¹³C-markiertes Glycerol und ATP in Glycerol-3-phosphat umzuwandeln. Diese glpK-Mutante wurde durch genomische PCR unter Verwendung der Primer-Kombinationen SEQ ID NO:8 und SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:11 sowie SEQ ID NO:8 und SEQ ID NO:11 weiter analysiert, was die erwarteten 2,3-kb-, 2,4-kb- bzw. 4,0-kb-PCR-Fragmente ergab. Die Wildtyp-Kontrolle ergab mit den Primern SEQ ID NO:8 und SEQ ID NO:11 die erwartete 3,5-kb-Bande. Die glpK-Mutante RJF10m wurde mit dem Plasmid pAH48 elektrotransformiert, um Glycerol-Herstellung aus Glucose zu erlauben. Die glpK-Mutante E. coli RRJF10m ist bei der ATCC unter den Bedingungen des Budapester Vertrages am 24. November 1997 hinterlegt worden.

Bearbeitung der Glycerol-Kinase-Mutanten RJF10 mit entfernter Chloramphenicol-Resistenzgen-Unterbrechung:

[0180] Nach dem Wachstum über Nacht auf YENB-Medium (0,75% Hefeextrakt, 0,8% Nährstoffbrühe) bei 37°C wurde E. coli RRJF10m in einer Wassersuspension mit dem Plasmid pJW168 (unveröffentlichte Ergebnisse), welches das Bakteriophagen-P1-Cre-Rekombinase-Gen enthielt, unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren lacUV5-Promotors, eines temperaturempfindlichen pSC101-Replicons und eines Ampicillin-Resistenzgens elektrotransformiert. Bei Auswuchs in SOC-Medium bei 30°C wurden Transformanten bei 30°C (zulässige Temperatur für pJW168-Replikation) auf LB-Agarmedium, ergänzt mit Carbenicillin (50 µg/ml) und IPTG (1 mM), ausgewählt. Zwei serielle Übernachts-Transfers von gepoolten Kolonien wurden bei 30°C auf frischem LB-Agarmedium, ergänzt mit Carbenicillin und IPTG, ausgeführt, um Excision des chromosomalen Chloramphenicol-Resistenzgens über Rekombination an den loxP-Stellen, vermittelt durch die Cre-Rekombinase, zu erlauben (Hoess und Abremski, J. Mol. Biol. 181, 351–362 (1985)). Resultierende Kolonien wurden auf LB-Agarmedium, ergänzt mit Carbenicillin und IPTG, und LB-Agar, ergänzt mit Chloramphenicol (12,5 µg/ml), repliziert, um Kolonien zu identifizieren, die Carbenicillin-resistent und Chloramphenicol-empfindlich waren, was Entfernung des Markergens anzeigt. Eine Kultur über Nacht bei 30°C einer derartigen Kolonie wurde verwendet, um 10 ml von LB-Medium zu beimpfen. Bei Wachstum bei 30°C zu der OD (600 nm) von 0,6 AU wurde die Kultur bei 37°C über Nacht inkubiert. Verschiedene Verdünnungen wurden auf vorgewärmtem LB-Agarmedium plattiert und die Platten wurden über Nacht bei 42°C (die nicht-zulässige Temperatur für pJW168-Replikation) inkubiert. Resultierende Kolonien wurden auf LB-Agarmedium und LB-Agarmedium, ergänzt mit Carbenicillin (75 µg/ml), repliziert, um Kolonien zu identifizieren, die Carbenicillin-empfindlich waren, was den Verlust von Plasmid pJW168 anzeigt. Eine derartige glpK-Mutante, RJF10, wurde durch genomische PCR unter Verwendung der Primer SEQ ID NO:8 und SEQ ID NO:11 weiter analysiert und ergab die erwartete 3,0-kb-Bande, die die Excision des Markergens bestätigt. Glycerol-nicht-Nutzung durch die Mutante RJF10 wurde durch das Fehlen von Wachstum auf M9-Minimalmedium, enthaltend 1 mM Glycerol, bestätigt. Die glpK-Mutante RJF10

wurde mit dem Plasmid pAH48 elektrotransformiert, um Glycerolherstellung aus Glucose zu erlauben.

BEISPIEL 3

KONSTRUKTION VON E.-COLI-STAMM MIT GLDA-GEN-KNOCKOUT

[0181] Das *gldA*-Gen wurde aus *E. coli* durch PCR isoliert (K. B. Mullis und F. A. Faloona, *Meth. Enzymol.* ISS, 335–350 (1987)), indem die Primer SEQ ID NO:12 und SEQ ID NO:13 verwendet wurden, welche terminale SphI- bzw. XbaI-Stellen einbringen, und zwischen den SphI- und XbaI-Stellen in pUC18 kloniert (T. Maniatis (1982), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Molekulares Klonieren: Ein Laborhandbuch), Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor, NY), um pKP8 zu erzeugen. pKP8 wurde an den einzigartigen Sall- und NcoI-Stellen innerhalb des *gldA*-Gens geschnitten, die Enden mit Klenow gespült und religiert, resultierend in einer 109-bp-Deletion in der Mitte von *gldA* und Regenerierung einer einzigartigen Sall-Stelle, um pKP9 zu erzeugen. Ein 1,4-kb-DNA-Fragment, enthaltend das Gen, übertragend Kanamycin-Resistenz (*kan*) und einschließlich etwa 400 bps von DNA stromaufwärts von dem translationalen Startcodon und etwa 100 bps von DNA stromabwärts von dem translationalen Stopcodon, wurde aus pET-28a(+) (Novagen, Madison, Wis) durch PCR unter Verwendung der Primer SEQ ID NO:14 und SEQ ID NO:15, welche terminate Sall-Stellen einbringen, isoliert und in die einzigartige Sall-Stelle von pKP9 subkloniert, um pKP13 zu erzeugen. Ein 2,1-kb-DNA-Fragment, beginnend 204 bps stromabwärts von dem translationalen *gldA*-Startcodon und endend 178 bps stromaufwärts von dem translationalen *gldA*-Stopcodon und enthaltend die *kan*-Insertion, wurde aus pKP13 durch PCR unter Verwendung der Primer SEQ ID NO:16 und SEQ ID NO:17, welche terminate SphI- bzw. XbaI-Stellen einbringen, isoliert, wurde zwischen den SphI- bzw. XbaI-Stellen in pMAK705 (Genencor International, Palo Alto, CA) subkloniert, um pMP33 zu erzeugen. *E. coli* FM5 wurde mit pMP33 transformiert und auf 20 µg/ml *kan* bei 30°C, welches die zulässige Temperatur für pMAK705-Replikation ist, ausgewählt. Eine Kolonie wurde über Nacht bei 30°C in flüssigen Medien, ergänzt mit 20 µg/ml *kan*, expandiert. Ungefähr 32000 Zellen wurden auf 20 µg/ml *kan* plattiert und für 16 h bei 44°C, welches die restriktive Temperatur für pMAK705-Replikation ist, inkubiert. Transformanten, die bei 44°C wuchsen, haben Plasmid in das Chromosom integriert, vorkommend mit einer Frequenz von ungefähr 0,0001. Analysen mit PCR und Southern-Blot (*E. M. Southern, J. Mol. Biol.* 98, 503–517 (1975)) wurden verwendet, um die Natur der chromosomalen Integrationsereignisse in den Transformanten zu bestimmen. Western-Blot-Analyse (Towbin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 4350 (1979)) wurde verwendet, um zu bestimmen, ob Glycerol-Dehydrogenase-Protein, das Produkt von *gldA*, in den Transformanten erzeugt wird. Ein Aktivitäts-Assay wurde verwendet, um zu bestimmen, ob Glycerol-Dehydrogenase-Aktivität in den Transformanten verblieb. Die Aktivität in Glycerol-Dehydrogenase-Banden auf nativen Gelen wurde durch Koppeln der Umwandlung von Glycerol plus NAD⁺ in Dihydroxyaceton plus NADH mit der Umwandlung eines Tetrazoliumfarbstoffs, MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid] zu einem tief gefärbten Formazan mit Phenazinmethosulfat als Vermittler bestimmt. Glycerol-Dehydrogenase erfordert auch die Anwesenheit von 30 mM Ammoniumsulfat und 100 mM Tris, pH 9 (Tang et al., *J. Bacteriol.* 140, 182 (1997)). Von 8 analysierten Transformanten wurden 6 bestimmt, *gldA*-Knockouts zu sein. *E. coli* MSP33.6 wurde bei der ATCC unter den Bestimmungen des Budapestervertrages am 24. November 1997 hinterlegt.

BEISPIEL 4

KONSTRUKTION EINES E.-COLI-STAMMS MIT GLPK- UND GLDA-GEN-KNOCKOUTS

[0182] Ein 1,6-kb-DNA-Fragment, enthaltend das *gldA*-Gen und einschließlich 228 bps von DNA stromaufwärts von dem translationalen Startcodon und 220 bps von DNA stromabwärts von dem translationalen Stopcodon, wurde aus *E. coli* durch PCR unter Verwendung der Primer SEQ ID NO:18 und SEQ ID NO:19, welche terminale SphI- bzw. XbaI-Stellen einbringen, isoliert und zwischen den SphI- und XbaI-Stellen von pUC18 kloniert, um pQN2 zu erzeugen. pQN2 wurde an den einzigartigen Sall- und NcoI-Stellen innerhalb des *gldA*-Gens geschnitten, die Enden mit Klenow gespült und religiert, resultierend in einer 109-bps-Deletion in der Mitte von *gldA* und Regenerierung einer einzigartigen Sall-Stelle, um pQN4 zu erzeugen. Ein 1,2-kb-DNA-Fragment, enthaltend das Gen, übertragend Kanamycin-Resistenz (*kan*) und flankiert durch loxP-Stellen, wurde aus pLoxKan2 (Genencor International, Palo Alto, CA) als StuI/XhoI-Fragment isoliert, die Enden mit Klenow gespült und nach dem Spülen mit Klenow in pQN4 an der Sall-Stelle subkloniert, um pQN8 zu erzeugen. Ein 0,4-kb-DNA-Fragment, enthaltend den R6K-Replikationsursprung, wurde aus pGP704 (Miller und Mekalanos, *J. Bacteriol.* 170, 2575–2583 (1988)) durch PCR unter Verwendung der Primer SEQ ID NO:20 und SEQ ID NO:21, welche terminate SphI- bzw. XbaI-Stellen einbringen, isoliert und mit dem 2,8-kb-SphI/XbaI-DNA-Fragment, enthaltend die *gldA::kan*-Kassette aus pQN8, ligiert, um pKP22 zu erzeugen. Ein 1,0-kb-DNA-Fragment, enthaltend das Gen, übertragend Chloramphenicol-Resistenz (*cam*) und flan-

kiert durch loxP-Stellen, wurde aus pLoxCat2 (Genencor International, Palo Alto, CA) als XbaI-Fragment isoliert und in pKP22 an der XbaI-Stelle subkloniert, um pKP23 zu erzeugen. Der E.-coli-Stamm RJF10 (siehe Beispiel 2), welcher glpK- ist, wurde mit pKP23 transformiert, und Transformanten mit dem Phänotyp kan^rcamS wurden isoliert, was Doppelcrossover-Integration anzeigte, welche durch Southern-Blot-Analyse bestätigt wurde. Assays der Glycerol-Dehydrogenase-Gelaktivität (wie beschrieben in Beispiel 3) demonstrierten, daß aktive Glycerol-Dehydrogenase in diesen Transformanten nicht vorhanden war. Der kan-Marker wurde aus dem Chromosom unter Verwendung des Cre-erzeugenden Plasmids pJW168, wie in Beispiel 2 beschrieben, entfernt, um den Stamm KLP23 zu erzeugen. Verschiedene Isolate mit dem Phänotyp kan^rS demonstrieren keine Glycerol-Dehydrogenase-Aktivität und Southern-Blot-Analyse bestätigte den Verlust des kan-Markers.

BEISPIEL 5

PLASMIDKONSTRUKTION UND STRANGKONSTRUKTION FÜR DIE EXPRESSION VON GLYCEROL-3-PHOSPHAT-DEHYDROGENASE (DAR1) UND/ODER GLYCEROL-3-PHOSPHATASE (GPP2)

Konstruktion von Expressionskassetten für Glycerol-3-Phosphatase (gpp2):

[0183] Der *Saccharomyces cerevisiae*-Chromosom-V-lambda-Klon 6592 (GenBank, Zugang # U18813x11) wurde vom ATCC erhalten. Das Glycerol-3-phosphat-Phosphatase-Gen (GPP2) wurde durch Klonieren aus dem lambda-Klon als Ziel-DNA unter Verwendung von synthetischen Primern (SEQ ID NO:22 mit SEQ ID NO:23) kloniert, wobei eine BamHI-RBS-XbaI-Stelle an dem 5'-Ende und eine SmaI-Stelle an dem 3'-Ende eingebracht wurden. Das Produkt wurde in das pCR-Script (Stratagene, Madison, WI) an der SrfI-Stelle subkloniert, um das Plasmid pAH15, enthaltend GPP2, zu erzeugen. Das Plasmid pAH15 enthält das GPP2-Gen in der inaktiven Orientierung zur Expression aus dem lac-Promotor in pCR-Script SK+. Das BamHI-SmaI-Fragment aus pAH15, enthaltend das GPP2-Gen, wurde in pBlueScriptII SK+ inseriert, um das Plasmid pAH19 zu erzeugen. Das pAH19 enthält das GPP2-Gen in der korrekten Orientierung zur Expression aus dem lac-Promotor. Das XbaI-PstI-Fragment aus pAH19, enthaltend das GPP2-Gen, wurde in pPHOX2 inseriert, um das Plasmid pAH21 zu erzeugen. Das pAH21/DH5 α ist das Expressionsplasmid.

Konstruktion von Expressionskassetten für Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase (DAR1):

[0184] DAR1 wurde durch PCR-Klonierung aus genomischer *S. cerevisiae*-DNA unter Verwendung von synthetischen Primern (SEQ ID NO:24 mit SEQ ID NO:25) isoliert. Erfolgreiche PCR-Klonierung plazierte eine NcoI-Stelle an dem 5'-Ende von DAR1, wo das ATG innerhalb NcoI der DAR1-Initiator Methionin ist. An dem 3'-Ende von DAR1 wird nach dem Translationsterminator eine BamHI-Stelle eingeführt. Die PCR-Fragmente wurden mit NcoI + BamHI digestiert und in die gleichen Stellen innerhalb des Expressionsplasmids pTrc99A (Pharmacia, Piscataway, NJ) kloniert, um pDAR1A zu ergeben.

[0185] Um eine bessere Ribosombindungsstelle an dem 5'-Ende von DAR1 zu erzeugen, wurde ein SpeI-RBS-NcoI-Linker, erhalten durch Verschmelzen synthetischer Primer (SEQ ID NO:26 mit SEQ ID NO:27), in die NcoI-Stelle von pDAR1A inseriert, um pAH40 zu erzeugen. Das Plasmid pAH40 enthält die neue RBS und DAR1-Gen in der korrekten Orientierung zur Expression aus dem trc-Promotor von pTrc99A (Pharmacia, Piscataway, NJ). Das NcoI-BamHI-Fragment aus pDAR1A und einer zweiten Gruppe von SpeI-RBS-NcoI-Linker, erhalten durch Verschmelzen synthetischer Primer (SEQ ID NO:28 mit SEQ ID NO:29), wurde in die SpeI-BamHI-Stelle von pBC-SK+ (Stratagene, Madison, WI) inseriert, um das Plasmid pAH42 zu erzeugen. Das Plasmid pAH42 enthält ein Chloramphenicol-resistentes Gen.

Konstruktion von Expressionskassetten für dar1 und gpp2:

[0186] Expressionskassetten für DAR1 und GPP2 wurden aus den vorstehend beschriebenen individuellen DAR1- und GPP2-Subklonen unter Verwendung von Standardverfahren der Molekularbiologie zusammengesetzt. Das BamHI-PstI-Fragment aus pAH19, enthaltend die ribosomale Bindungsstelle (RBS) und das GPP2-Gen, wurde in pAH40 inseriert, um pAH43 zu erzeugen. Das BamHI-PstI-Fragment aus pAH19, enthaltend die RBS und das GPP2-Gen, wurde in pAH42 inseriert, um pAH45 zu erzeugen.

[0187] Die Ribosombindungsstelle an dem 5'-Ende von GPP2 wurde wie folgt modifiziert. Ein BamHI-RBS-SpeI-Linker, erhalten durch Verschmelzen der synthetischen Primer GATCCAGGAAACAGA (SEQ ID NO:30) mit CTAGTCTGTTTCCTG (SEQ ID NO:31) mit dem XbaI-PstI-Fragment von pAH19, enthaltend das GPP2-Gen, wurde in die BamHI-PstI-Stelle von pAH40 inseriert, um pAH48 zu erzeugen. Das Plasmid pAH48

enthält das DAR1-Gen, die modifizierte RBS und das GPP2-Gen in der korrekten Orientierung zur Expression aus dem trc-Promotor von pTrc99A (Pharmacia, Piscataway, NJ).

Transformation von E. coli:

[0188] Die hier beschriebenen Plasmide wurden unter Verwendung von Standardtechniken der Molekularbiologie in E. coli DH5 α , FM5 und KLP23 transformiert. Die Transformanten wurden durch ihr DNA-RFLP-Muster bestätigt.

BEISPIEL 6

KONSTRUKTION VON EXPRESSIONSPASMIDEN ZUR VERWENDUNG IN DER TRANSFORMATION VON ESCHERICHIA COLI MIT GENEN AUS DEM KLEBSIELLA-PNEUMONIAE-DHA-REGULON

Konstruktion des Expressionsvektors pTacIq.

[0189] Der E.-coli-Expressionsvektor pTacIQ wurde durch Insertieren von lacIq-Gen (Farabaugh, Nature 274 (5673), 765–769 (1978)) und tac-Promotor (Amann et al., Gene 25, 167–178 (1983)) in die Restriktionsendonuclease-Stelle EcoRI von pBR322 (Sutcliffe, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 43, 77–90 (1979)) hergestellt. Eine mehrfache Klonierungsstelle und Terminatorsequenz (SEQ ID NO:32) ersetzt die pBR322-Sequenz von EcoRI bis SphI.

Subklonierung der Glycerol-Dehydratase-Gene (dhaB1,2,3,X):

[0190] Der offene Leserahmen für das dhaB3-Gen wurde aus pHK28-26 durch PCR amplifiziert, indem Primer (SEQ ID NO:33 und SEQ ID NO:34) verwendet wurden, die eine EcoRI-Stelle an dem 5'-Ende und eine XbaI-Stelle an dem 3'-Ende einbringen. Das Produkt wurde in pLitmus29 (New England Biolab, Inc., Beverly, MA) subkloniert, um das Plasmid pDHAB3, enthaltend dhaB3, zu erzeugen.

[0191] Die Region, enthaltend die gesamte Codierungsregion für dhaB1, dhaB2, dhaB3 und dhaBX des dhaB-Operons aus pHK28-26, wurde unter Verwendung der Restriktionsenzyme KpnI und EcoRI in pBluescriptIIKS+ (Stratagene, La Jolla, CA) kloniert, um das Plasmid pM7 zu erzeugen.

[0192] Das dhaBX-Gen wurde durch Digestieren des Plasmids pM7 mit ApaI und XbaI, Reinigen des 5,9-kb-Fragments und dessen Ligieren mit dem 325-bp-ApaI-XbaI-Fragment aus dem Plasmid pDHAB3 entfernt, um pM11, enthaltend dhaB1, dhaB2 und dhaB3, zu erzeugen.

[0193] Der offene Leserahmen für das dhaB1-Gen wurde aus pHK28-26 durch PCR amplifiziert, indem Primer (SEQ ID NO:35 und SEQ ID NO:36) verwendet wurden, die eine HindIII-Stelle und eine Consensus-Ribosombindungsstelle an dem 5'-Ende und eine XbaI-Stelle an dem 3'-Ende einbringen. Das Produkt wurde in pLitmus28 (New England Biolab, Inc., Beverly, MA) subkloniert, um das Plasmid pDT1, enthaltend dhaB1, zu erzeugen.

[0194] Ein NotI-XbaI-Fragment aus pM11, enthaltend einen Teil des dhaB1-Gens, des dhaB2-Gens und des dhaB3-Gens, wurde in pDT1 inseriert, um das dhaB-Expressionsplasmid, pDT2, zu erzeugen. Das HindIII-XbaI-Fragment, enthaltend die dhaB(1,2,3)-Gene aus pDT2, wurde in pTacIQ inseriert, um pDT3 zu erzeugen.

Subklonieren des 1,3-Propandiol-Dehydrogenase-Gens (dhaT):

[0195] Das KpnI-SacI-Fragment von pHK28-26, enthaltend das 1,3-Propandiol-Dehydrogenase-(dhaT)-Gen, wurde in pBluescriptII KS+ subkloniert, wobei das Plasmid pAH1 erzeugt wurde. Das dhaT-Gen wurde durch PCR aus pAH1 als Templat-DNA und synthetische Primer (SEQ ID NO:37 mit SEQ ID NO:38), die eine XbaI-Stelle an dem 5'-Ende und eine BamHI-Stelle an dem 3'-Ende einbringen, amplifiziert. Das Produkt wurde in das pCR-Script (Stratagene) an der SrfI-Stelle subkloniert, um die Plasmide pAH4 und pAH5, enthaltend dhaT, zu erzeugen. Das Plasmid pAH4 enthält das dhaT-Gen in der richtigen Orientierung zur Expression aus dem lac-Promotor in das pCR-Script, und pAH5 enthält dhaT-Gen in der entgegengesetzten Orientierung. Das XbaI-BamHI-Fragment aus pAH4, enthaltend das dhaT-Gen, wurde in pTacIQ inseriert, um das Plasmid pAH8 zu erzeugen. Das HindIII-BamHI-Fragment aus pAH8, enthaltend die RBS und das dhaT-Gen, wurde in pBluescriptIIKS+ inseriert, um pAH11 zu erzeugen.

Konstruktion einer Expressionskassette für dhaT und dhaB(1,2,3):

[0196] Eine Expressionskassette für dhaT und dhaB(1,2,3) wurde aus den früher beschriebenen individuellen dhaB(1,2,3)- und dhaT-Subklonen unter Verwendung von Standardverfahren der Molekularbiologie zusammengesetzt. Ein SpeI-SacI-Fragment, enthaltend die dhaB(1,2,3)-Gene aus pDT3, wurde in pAH11 an den SpeI-SacI-Stellen inseriert, um pAH24 zu erzeugen. Ein Sall-XbaI-Linker (SEQ ID NO:39 und SEQ ID NO:40) wurde in pAH5 inseriert, das mit den Restriktionsenzymen Sall-XbaI digestiert wurde, um pDT16 zu erzeugen. Der Linker zerstört die XbaI-Stelle. Das 1-kb-Sall-MluI-Fragment aus pDT16 wurde dann in pAH24 inseriert, wobei das existierende Sall-MluI-Fragment ersetzt wurde, um pDT18 zu erzeugen. pDT21 wurde durch Inserieren des Sall-NotI-Fragments aus pDT18 und des NotI-XbaI-Fragment aus pM7 in pCL 1920 (SEQ ID NO:41) konstruiert. Die Glucose-Isomerase-Promotor-Sequenz aus Streptomyces (SEQ ID NO:42) wurde durch PCR kloniert und in EcoRI-HindIII-Stellen von pLitmus28 inseriert, um pDT5 zu konstruieren. pCL1925 wurde durch Inserieren des EcoRI-PvuII-Fragments aus pDT5 in die EcoRI-PvuII-Stelle von pCL 1920 konstruiert. pDT24 wurde durch Klonieren des HindIII-MluI-Fragments von pDT21 und des MluI-XbaI-Fragments von pDT21 in die HindIII-XbaI-Stellen von pCL 1925 konstruiert.

Konstruktion einer Expressionskassette für dhaT und dhaB(1,2,3,X):

[0197] pDT21 wurde durch Inserieren des Sall-NotI-Fragments aus pDT18 und des NotI-XbaI-Fragments aus pM7 in pCL 1920 (SEQ ID NO:41) konstruiert. Die Glucose-Isomerase-Promotor-Sequenz aus Streptomyces (SEQ ID NO:42) wurde durch PCR kloniert und in EcoRI-HindIII-Stellen von pLitmus28 inseriert, um pDT5 zu konstruieren. pCL1925 wurde durch Inserieren des EcoRI-PvuII-Fragments von pDT5 in die EcoRI-PvuII-Stelle von pCL 1920 konstruiert. pDT24 wurde durch Klonieren des HindIII-MluI-Fragments von pDT21 und des MluI-XbaI-Fragments von pDT21 in die HindIII-XbaI-Stellen von pCL1925 konstruiert.

Konstruktion einer Expressionskassette für dhaR, orfY, dhaT, orfX, orfW und dhaB(1,2,3,X):

[0198] pDT29 wurde durch Inserieren des SacI-EcoRI-Fragments von pHK28-26 in SacI-EcoRI-Stellen von pCL1925 konstruiert.

Konstruktion einer Expressionskassette für dhaR, orfY, orfX, orfW und dhaB(1,2,3,X):

[0199] Ein Derivat von Plasmid pDT29 wurde konstruiert, in welchem alle außer den ersten 5 und den letzten 5 Codons (plus Stopcodon) des Gens dhaT durch eine Technik, bekannt als PCR-vermittelte Überlappungsexension, deletiert wurden. Unter Verwendung von pDT29 als Templat wurden 2 primäre PCR-Produkte erzeugt, indem die folgenden Primer verwendet wurden:

SEQ ID NO:43 = 5'GAC GCA ACA GTA TTC CGT CGC3';

SEQ ID NO:44 = 5'ATG AGC TAT CGT ATG TTC CGC CAG GCA TTC TGA GTG TTA
ACG3';

SEQ ID NO:45 = 5'GCC TGG CGG AAC ATA CGA TAG CTC ATA ATA TAC3';

SEQ ID NO:46 = 5'CGG GGC GCT GGG CCA GTA CTG3'.

[0200] SEQ ID NO:45 wurde mit SEQ ID NO:46 gepaart, um ein Produkt von 931 bps und einschließlich Nucleinsäure einschließlich 5'dhaB1 (an der einzigartigen Scal-Stelle), alle von orfY und die ersten fünf Codons von dhaT, zu erzeugen. SEQ ID NO:43 wurde mit SEQ ID NO:44 gepaart, um ein Produkt von 1348 bps und einschließlich Nucleinsäure einschließlich der letzten fünf Codons (plus Stopcodon) von dhaT, allen von orfX, allen von orfW und 5'dhaR (an der einzigartigen SapI-Stelle) zu erzeugen. Die 15 Basen an dem 5'-Ende von SEQ ID NO:44 bilden einen Schwanz, der das inverse Komplement eines 15-Basen-Anteils von SEQ ID NO:45 ist. Ähnlich bilden die 11 Basen an dem 5'-Ende von SEQ ID NO:45 einen Schwanz, der das inverse Komplement eines 11-Basen-Anteils von SEQ ID NO:44 ist. So wurden die zwei primären PCR-Produkte nach dem Verschmelzen (über 26 bp Schwanzüberlappen) und Erweitern durch PCR miteinander verbunden, um ein drittes Nucleinsäureprodukt von 2253 bps zu erzeugen. Dieses dritte PCR-Produkt wurde mit SapI und Scal digestiert und in pDT29 ligiert, welches ebenfalls mit SapI und Scal digestiert wurde, um das Plasmid pKP32 zu erzeugen, welches identisch mit pDT29 ist, ausgenommen die große in-frame-Deletion innerhalb dhaT.

BEISPIEL 7

UMWANDLUNG VON GLUCOSE IN 1,3-PROPANDIOL UNTER VERWENDUNG DES E.-COLI-STAMMES
KLP23/pAH48/pDT29 UND DAS VERBESSERTES VERFAHREN UNTER VERWENDUNG VON
KLP23/pAH48/pKP32

Vorkultur:

[0201] KLP23/pAH48/pDT29 und KLP23/pAH48/pKP32 wurden zum Beimpfen eines Fermenters in 2YT-Medium (10 g/l Hefeextrakt, 16 g/l Trypton und 10 g/l NaCl), enthaltend 200 mg/l Carbenicillin (oder Ampicillin) und 50 mg/l Spectinomycin, vorkultiviert. KLP23/pAH48/pKP32 ist identisch mit KLP23/pAH48/pDT29, außer daß dhaT deletiert ist.

[0202] Die Kulturen wurden aus gefrorenen Ausgangsmaterialien (10% DMSO als Cryoprotectant) in 500 ml Medium in einem 2-l-Erlenmeyer-Kolben gestartet, bei 35°C in einem Schüttelapparat mit 250 U/min gezüchtet, bis eine OD₅₅₀ von ungefähr 1,0 AU erreicht wurde, und verwendet, um den Fermenter zu beimpfen.

Fermentermedium:

[0203] Die folgenden Komponenten wurden zusammen in dem Fermentergefäß sterilisiert: 45 g KH₂PO₄, 12 g Citronensäure, 12 g MgSO₄·7H₂O, 30 g Hefeextrakt, 2,0 g Eisenammoniumcitrat, 5 ml Mazu DF204 als Antischaum, 1,2 g CaCl₂·2H₂O und 7,3 ml Schwefelsäure. Der pH wurde mit 20–28%iger NH₄OH auf 6,8 erhöht und die folgenden Komponenten wurden hinzugegeben: 1,2 g Carbenicillin oder Ampicillin, 0,30 g Spectinomycin, 60 ml einer Lösung von Spurenelementen und Glucose (von einer 60–67gew.%igen Zufuhr). Nach der Beimpfung betrug das Volumen 6,0 l, und die Glucosekonzentration betrug 10 g/l. Die Lösung von Spurenelementen enthielt (g/l): Citronensäure H₂O (4,0), MnSO₄·H₂O (3,0), NaCl (1,0), FeSO₄·7H₂O (0,10), CoCl₂·6H₂O (0,10), ZnSO₄·7H₂O (0,10), CuSO₄·5H₂O (0,010), H₃BO₃ (0,010) und Na₂MoO₄·2H₂O (0,010).

Fermentationswachstum:

[0204] Ein 15-l-Rührtankfermenter wurde mit dem vorstehend beschriebenen Medium vorbereitet. Die Temperatur wurde auf 35°C geregelt und wässriger Ammoniak (20–28 Gew.-%) wurde verwendet, um den pH auf 6,8 zu regeln. Anfängliche Werte für den Luftdurchsatz (eingestellt auf minimale Werte zwischen 6 und 12 Standardliter pro min) und Rührergeschwindigkeit (eingestellt auf minimale Werte zwischen 350 und 690 U/min) wurden so eingestellt, daß die Regelung des gelösten Sauerstoffs (DO) begonnen wurde, wenn die OUR-Werte ungefähr 140 mmol/l/h erreichten. Der Rückdruck wurde auf 0,5 bar gesteuert. Die DO-Steuerung wurde auf 10% eingestellt. Ausgenommen kleinere Abweichungen wurde die Glucose mit einer Zufuhr von 60% oder 67% (Gew.) zwischen 0 g/l und 10 g/l gehalten. Vitamin B₁₂ oder Coenzym B₁₂ wurden wie nachstehend vermerkt hinzugegeben.

Fermentation mit KLP23/pAH48/pDT29:

[0205] Eine Zusammenfassung einer repräsentativen Fermentation der Umwandlung von Glucose in 1,3-Propandiol (1,3-PD) unter Verwendung des E.-coli-Stammes KLP23/pAH48/pDT29 wird in Tabelle 4 gegeben. Vitamin B₁₂ (0,075 g/l, 500 ml) wurde, beginnend 3 h nach der Beimpfung, mit einer Geschwindigkeit von 16 ml/h zugeführt. Die Ausbeute an 1,3-Propandiol betrug 24 Gew.-% (g 1,3-Propandiol/g verbrauchte Glucose), und ein Titer von 68 g/l 1,3-Propandiol wurde erhalten.

TABELLE 4: ZUSAMMENFASSUNG EINER REPRÄSENTATIVEN FERMENTATION DER UMWANDLUNG VON GLUCOSE IN 1,3-PROPANDIOL (1,3-PD) UNTER VERWENDUNG DES E.-COLI-STAMMES KLP23/PAH48/PDT29

Zeit (h)	OD550 (AU)	DO (%)	Glucose (g/l)	Glycerol (g/l)	1,3-PD (g/l)
0	0	150	12,9	0,0	0
6	17	80	8,3	3,1	1
12	42	53	2,8	12,5	9
18	98	9	5,7	12,6	32
24	136	11	32,8	12,0	51
30	148	10	12,3	13,3	62
32	152	11	12,5	14,3	65
38	159	11	1,5	17,2	68

[0206] Ähnliche Ergebnisse wurden mit einer identischen Zufuhr von Vitamin B₁₂ bei der doppelten Konzentration oder bei Bolus-Zugaben von Vitamin B₁₂ über den zeitlichen Ablauf der Fermentation erhalten. Der höchste erhaltene Titer war 77 g/l.

Verbesserte Fermentation mit KLP23/pAH48/pKP32:

[0207] Eine Zusammenfassung einer repräsentativen Fermentation der Umwandlung von Glucose in 1,3-Propandiol (1,3-PD) unter Verwendung des E.-coli-Stammes KLP23/pAH48/pDT32 wird in Tabelle 5 gegeben. Vitamin B₁₂ (0,150 g/l, 500 ml) wurde, beginnend 3 h nach der Beimpfung, mit einer Geschwindigkeit von 16 ml/h zugeführt. Nach 36 h wurden ungefähr 21 Fermentationsbrühe abgeführt, um die fortgesetzte Zugabe von Glucosezuführung zu erlauben. Die Ausbeute an 1,3-Propandiol betrug 26 Gew.-% (g 1,3-Propandiol/g verbrauchte Glucose) und ein Titer von 112 g/l 1,3-Propandiol wurde erhalten.

TABELLE 5: ZUSAMMENFASSUNG EINER REPRÄSENTATIVEN FERMENTATION DER VERBESSERTEN UMWANDLUNG VON GLUCOSE IN 1,3-PROPANDIOL (1,3-PD) UNTER VERWENDUNG DES E.-COLI-STAMMES KLP23/PAH48/PKP32

Zeit (h)	OD550 (AU)	DO (%)	Glucose (g/l)	Glycerol (g/l)	1,3-PD (g/l)
0	0	148	12,8	0,0	0
6	22	84	6,9	3,3	0
12	34	90	9,7	10,4	7
18	66	43	9,3	5,9	24
24	161	9	0,2	2,5	46
30	200	10	0,2	6,0	67
36	212	10	1,2	9,7	88
42	202	2	0,1	15,5	98
48	197	12	1,2	23,8	112

[0208] Ähnliche Ergebnisse wurden mit einer identischen Vitamin B₁₂-Zufuhr bei der halben Konzentration oder bei Bolus-Zugaben von Vitamin B₁₂ über den zeitlichen Ablauf der Fermentation erhalten. Der höchste erhaltene Titer war 114 g/l.

BEARBEITUNG VON TRIOSEPHOSPHAT-ISOMERASE-MUTANTE VON E. COLI/KLP23 FÜR VERBES-
SERTE AUSBEUTE AN 1,3-PROPANDIOL AUS GLUCOSE

Konstruktion von Plasmid für Triosephosphat-Isomerase-Genersetzung in E. coli KLP23

[0209] Genomische DNA von E. coli KLP23 wurde unter Verwendung des Puregene DNA Isolation Kit (Gentra Systems, Minneapolis, MN) hergestellt. Ein 1,0-kb-DNA-Fragment, enthaltend *cdh* und das 3'-Ende von Triosephosphat-Isomerase-(*tpiA*)-Genen wurde durch PCR (Mullis und Faloona, *Methods Enzymol.* 155, 335–350 (1987)) aus genomischer DNA von KLP23 unter Verwendung der Primer SEQ ID NO:47 und SEQ ID NO:48 amplifiziert. Ein 1,0-kb-DNA-Fragment, enthaltend das 5'-Ende von *tpiA*-, *yiiQ*- und das 5'-Ende von *yiiR*-Genen, wurde durch PCR aus genomischer DNA von KLP23 unter Verwendung der Primer SEQ ID NO:49 und SEQ ID NO:50 amplifiziert. Eine *Scal*-Stelle wurde in den Primer SEQ ID NO:49 eingebracht. Das 5'-Ende des Primers SEQ ID NO:49 war das reverse Komplement des Primers SEQ ID NO:48, um die nachfolgende PCR mit Überlappungsexension zu ermöglichen. Das Gen-Splicing durch die Überlappungsexensionstechnik (Horton et al., *BioTechniques* 8, 528–535 (1990)) wurde verwendet, um durch PCR unter Verwendung der vorstehenden zwei PCR-Fragmente als Template und der Primer SEQ ID NO:47 und SEQ ID NO:50 ein 2,0-kb-Fragment zu erzeugen. Dieses Fragment stellte eine Deletion von 73% des 768-bp-*tpiA*-Strukturgens dar. Insgesamt hatte dieses Fragment 1,0-kb-Flankierungsregionen auf jeder Seite der *Scal*-Klonierungsstelle (innerhalb des teilweisen *tpiA*), um chromosomale Genersetzung durch homologe Rekombination zu erlauben.

[0210] Das vorstehende, mit glatten Enden versehene 2,0-kb-PCR-Fragment wurde unter Verwendung des Zero Blunt PCR Cloning Kit (Invitrogen, San Diego, CA) in den pCR-Blunt-Vektor kloniert, um das 5,5-kb-Plasmid pRN106-2, enthaltend Kanamycin- und Zeocin-Resistenzgene, zu ergeben. Das 1,2-kb-*HincII*-Fragment von pLoxCat1 (unveröffentlichte Ergebnisse), enthaltend ein Chloramphenicol-Resistenzgen, flankiert von Bakteriophagen-P1-*loxP*-Stellen (Snaith et al., *Gene* 166, 173–174 (1995)), wurde verwendet, um das *tpiA*-Fragment in dem Plasmid pRN106-2 zu unterbrechen, indem es mit *Scal*-digestiertem Plasmid pRN106-2 ligiert wird, um das 6,8-kb-Plasmid pRN107-1 zu ergeben.

Bearbeitung der Triosephosphat-Isomerase-Mutante RJ8m durch lineare DNA-Transformation:

[0211] Unter Verwendung von pRNI07-1 als Templat und der Primer SEQ ID NO:47 und SEQ ID NO:50 wurde das 3,2-kb-Fragment, enthaltend *tpiA*-Flankierungsregionen und die *loxP*-*CmR*-*loxP*-Kassette, PCR-amplifiziert und geextrahiert. E.-coli-KLP23 wurde mit bis zu 1 µg von diesem linearen 3,2-kb-DNA-Fragment elektrotransformiert, und die Transformanten, die Chloramphenicol-resistent (12,5 µg/ml) und Kanamycin-empfindlich (30 µg/ml) waren, wurden weiter auf M9-Minimalmedien für schlechte Glucosenutzung auf 1 mM Glucose, für normale Gluconatnutzung auf 1 mM Gluconat und um den Phänotyp der Glycerolnichtnutzung des Wirts KLP23 auf 1 mM Glycerol zu sichern, gescreent. Ein *EcoRI*-Digest von genomischer DNA von einer derartigen Mutante, RJ8m, zeigte, wenn sondiert mit dem intakten *tpiA*-Gen über Southern-Analyse (Southern, *J. Mol. Biol.* 98, 503–517 (1975)), an, daß es ein Doppelcrossover-Integriant (*tpiA*-Genersetzung) war, da die zwei erwarteten Banden von 6,6 kb und 3,0 kb beobachtet wurden, zurückzuführen auf das Vorhandensein einer zusätzlichen *EcoRI*-Stelle innerhalb des Chloramphenicol-Resistenzgens. Wie erwartet ergaben der Wirt KLP23 und die Wildtyp-FM5-Kontrollen einzelne 8,9-kb- bzw. 9,4-kb-Banden. Diese *tpiA*-Mutante wurde durch genomische PCR unter Verwendung der Primer SEQ ID NO:51 und SEQ ID NO:52 weiter analysiert, welche das erwartete 4,6-kb-PCR-Fragment ergaben, während für das gleiche Primerpaar der Wirt KLP23 und die Wildtyp-FM5-Stämme beide das erwartete 3,9-kb-PCR-Fragment ergaben. Wenn zellfreie Extrakte aus der *tpiA*-Mutante RJ8m und dem Wirt KLP23 unter Verwendung von Glyceraldehyd-3-phosphat als Substrat auf *tpiA*-Aktivität getestet wurden, wurde bei RJ8m keine Aktivität beobachtet. Die *tpiA*-Mutante RJ8m wurde mit dem Plasmid pAH48 elektrotransformiert, um Glycerolherstellung aus Glucose zu erlauben, und auch mit den beiden Plasmiden pAH48 und pDT29 oder pKP32, um 1,3-Propandiol-Herstellung aus Glucose zu erlauben. Der Chloramphenicol-Resistenzmarker wurde aus RJ8m eliminiert, um RJ8 zu ergeben.

BEISPIEL 9

UMWANDLUNG VON GLUCOSE IN 1,3-PROPANDIOL UNTER VERWENDUNG DES E.-COLI-STAMMES
RJ8/PAH48/PDT29 UND DAS VERBESSERTERTE VERFAHREN UNTER VERWENDUNG VON
RJ8/PAH48/PKP32

Vorkultur:

[0212] RJ8/pAH48/pDT29 und RJ8/pAH48/pKP32 wurden zum Beimpfen eines Fermenters wie in Beispiel 7 beschrieben vorkultiviert. RJ8/pAH48/pKP32 ist identisch mit RJ8/pAH48/pDT29, außer daß dhaT deletiert ist.

Fermentermedium:

[0213] Das Fermentermedium war wie in Beispiel 7 beschrieben.

Fermentationswachstum:

[0214] Das Fermenterwachstum war wie in Beispiel 7 beschrieben, außer daß anfängliche Werte für Luftdurchsatz (eingestellt auf minimale Werte zwischen 5 und 6 Standardliter pro min) und Rührergeschwindigkeit (eingestellt auf minimale Werte zwischen 300 und 690 U/min) so eingestellt wurden, daß die Regelung des gelösten Sauerstoffs (DO) initiiert wurde, wenn die OUR-Werte zwischen 60 und 100 mmol/l/h erreichten. Vitamin B₁₂ oder Coenzym B₁₂ wurden wie vorstehend vermerkt hinzugegeben.

Fermentation mit RJ8/pAH48/pDT29:

[0215] Eine Zusammenfassung einer repräsentativen Fermentation der Umwandlung von Glucose in 1,3-Propandiol (1,3-PD) unter Verwendung des E.coli-Stammes RJ8/pAH48/pDT29 wird in Tabelle 6 gegeben. Vitamin B₁₂ wurde als Bolus-Zugaben von 2, 16 und 16 mg nach 2, 8 bzw. 26 h bereitgestellt. Die Ausbeute von 1,3-Propandiol war 35 Gew.-% (g 1,3-Propandiol/g verbrauchte Glucose) und ein Titer von 50,1 g/l 1,3-Propandiol wurde erhalten.

TABELLE 6: ZUSAMMENFASSUNG EINER REPRÄSENTATIVEN FERMENTATION DER UMWANDLUNG
VON GLUCOSE IN 1,3-PROPANDIOL (1,3-PD) UNTER VERWENDUNG DES E.-COLI-STAMMES
RJ8/pAH48/pDT29

Zeit (h)	OD550 (AU)	DO (%)	Glucose (g/l)	Glycerol (g/l)	1,3 PD (g/l)
0	0	140	10,6	0,1	0,0
6	5	107	11,1	0,5	0,4
10	16	90	8,5	1,7	1,3

Zeit (h)	OD550 (AU)	DO (%)	Glucose (g/l)	Glycerol (g/l)	1,3 PD (g/l)
14	25	86	1,8	2,4	5,9
19	38	53	3,5	5,9	15,4
25	53	38	0,1	9,2	26,7
31	54	10	4,5	7,4	39,0
37	37	23	17,2	6,0	45,0
43	21	13	9,9	7,7	50,1

Verbesserte Fermentation mit RJ8/pAH48/pKP32

[0216] Eine Zusammenfassung einer repräsentativen Fermentation der Umwandlung von Glucose in 1,3-Pro-

pandiol (1,3-PD) unter Verwendung des E.-coli-Stammes RJ8/pAH48/pKP32 wird in Tabelle 7 gegeben. Vitamin B₁₂ wurde als Bolus-Zugaben von 48 und 16 mg nach ungefähr 26 bzw. 44 h bereitgestellt. Die Ausbeute an 1,3-Propandiol war 34 Gew.-% (g 1,3-Propandiol/g verbrauchte Glucose) und ein Titer von 129 g/l 1,3-Propandiol wurde erhalten.

TABELLE 7: ZUSAMMENFASSUNG EINER REPRÄSENTATIVEN FERMENTATION DER VERBESSERTEN UMWANDLUNG VON GLUCOSE IN 1,3-PROPANDIOL (1,3-PD) UNTER VERWENDUNG DES E.-COLI-STAMMES RJ8/PAH48/PKP32

Zeit (h)	OD550 (AU)	DO (%)	Glucose (g/l)	Glycerol (g/l)	1,3 PD (g/l)
0	0	150	12,6	0,1	0,0
6	12	113	6,0	2,6	0
12	24	99	0,0	10,6	0
18	51	76	2,4	28,9	0
24	78	82	2,4	44,2	5
30	114	70	3,8	26,9	33
36	111	72	0,0	20,0	57
42	139	65	0,1	21,9	69
48	1571	36	0,1	22,4	79
55	158	25	0,2	21,4	94
64	169	14	0,1	15,8	113
72	169	12	0,1	13,4	119
74	162	14	0,1	14,8	129

BEISPIEL 10: IDENTIFIZIERUNG DER NICHT-SPEZIFISCHEN KATALYTISCHEN AKTIVITÄT VON E. COLI (YQHD) IN DEM VERBESSERTEN 1,3-PROPANDIOL-VERFAHREN

Demonstration von nicht-spezifischer katalytischer Aktivität in 1,3-Propandiol erzeugenden Fermentationen mit dem verbesserten Katalysator:

[0217] Ein Ganzzellen-Assay für 1,3-Propandiol-Dehydrogenase-Aktivität wurde verwendet, um zu demonstrieren, daß die nicht-spezifische katalytische Aktivität in E. coli unter fermentativen Bedingungen nach der Zugabe von Vitamin B₁₂ und der Herstellung von 3-Hydroxypropionaldehyd (3-HPA) vorhanden ist, aber nicht vorher. Ein rekombinanter E.-coli-Stamm, enthaltend die Plasmide der Glycerol-Herstellung und der 1,3-Propandiol-Herstellung, pAH48 bzw. pKP32, wurde in 10-l-Fermentern gezüchtet, im wesentlichen wie in Beispiel 7 beschrieben, aber in Abwesenheit von Vitamin B₁₂. Ein Vitamin B₁₂-Bolus (48 mg) wurde hinzugegeben, wenn die Tanks ungefähr 100 OD₅₀₀ erreichten. Aliquots von Zellen wurden aus den Tanks unmittelbar vor und 2 h nach der Vitamin B₁₂-Zugabe genommen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation gewonnen und in PBS-Puffer, enthaltend 150 µg/ml Chloramphenicol, um neue Proteinsynthese zu hemmen, zu ihrem ursprünglichen Volumen resuspendiert. Ein geeignetes Volumen der Chloramphenicol-behandelten Zellen wurde in mit Prallblechen versehene Kolben von 250 ml, enthaltend ein Reaktionsgemisch (PBS-Puffer, enthaltend 10 g/l Glucose, 10 g/l Glycerol, 1 mg/l Coenzym B₁₂ und 150 µg/ml Chloramphenicol) gegeben, so daß das finale Volumen 50 ml mit einer OD₅₅₀ von ungefähr 10 war. Die Kolben, geschützt vor Licht, wurden mit 250 U/min bei 35°C geschüttelt. Aliquots für die HPLC-Analyse wurden während der Zeit genommen. Zeitabhängige Herstellung von 3-HPA wurde in Kolben beobachtet, die Zellen, gewonnen aus dem Fermenter entweder vor oder nach der Vitamin B₁₂-Zugabe, enthielten. In direktem Gegensatz wurden bedeutende Niveaus von 1,3-Propandiol nur in denjenigen Kolben beobachtet, die Zellen enthielten, die aus dem Fermenter nach der Vitamin B₁₂-Zugabe gewonnen wurden.

Nachweis nicht-spezifischer katalytischer Aktivität in zellfreien Extrakten

[0218] Ein Färbungsassay für native Gelaktivität wurde verwendet, um nicht-spezifische katalytische Aktivität in zellfreien Extrakten zu demonstrieren. Zellen wurden, vor und nach der Vitamin B₁₂-Zugabe, aus repräsentativen 10-l-Fermentationen unter Anwendung rekombinanter E.-coli-Stämme, enthaltend die Plasmide der

Glycerol-Herstellung und 1,3-Propandiol-Herstellung, pAH48 bzw. pKP32, gewonnen; und zellfreie Extrakte wurden durch Zellzerstörung unter Verwendung einer French-Press hergestellt. Die zellfreien Extrakte, eine Zubereitung von reiner *Klebsiella pneumoniae*-1,3-Propandiol-Dehydrogenase (dhaT) und Molekulargewichtsstandards wurden auf native Gradient-Polyacrylamidgele aufgebracht und darauf auslaufen gelassen. Die Gele wurden dann entweder den Substraten 1,3-Propandiol und NAD⁺ oder Ethanol und NAD⁺ ausgesetzt. Wie erwartet wurde in den Gelen, wo 1,3-Propandiol das Substrat war, eine Aktivitätsfärbung für DhaT beobachtet, welche auf dem nativen Gel mit ungefähr 340 Kda wanderte. Diese Aktivität wurde nur auf Bahnen beobachtet, wo reine *Klebsiella pneumoniae*-1,3-Propandiol-Dehydrogenase aufgebracht wurde. Im Gegensatz dazu wurde, wo 1,3-Propandiol das Substrat war und zellfreie Axtrakte nach Vitamin B₁₂ aufgebracht wurden, eine nicht-spezifische katalytische Aktivität bei ungefähr 90 Kda beobachtet. Wenn Ethanol als Substrat verwendet wurde, waren weder die DhaT-Bande noch die Bande der nicht-spezifischen katalytischen Aktivität sichtbar, aber eine separate Bande wurde vor und nach der Vitamin-B₁₂-Zugabe bei ungefähr 120 Kda gefunden. Diese neue Bande stellt sehr wahrscheinlich eine Alkohol-Dehydrogenase mit einer Spezifität in Richtung Ethanol als Substrat dar, wie sie typischerweise in allen Organismen gefunden wird.

[0219] Dieser Assay mit nativem Gel, wo Proteine vor dem Schritt des enzymatischen Assays nach dem Molekulargewicht getrennt werden, bot größere Empfindlichkeit und Genauigkeit beim Messen der Reduktion von 1,3-Propandiol in denjenigen Konstrukten mit niedriger Aktivität und wo die Aktivität wahrscheinlich verschieden von der von Alkohol-Dehydrogenasen mit Spezifität in Richtung zu Ethanol als Substrat ist, die für *E. coli* gut charakterisiert worden sind und in allen Organismen gefunden werden. Der Dehydrogenase-Assay arbeitet nach dem Prinzip, daß Dehydrogenase die Übertragung von Elektronen von 1,3-Propandiol (oder anderen Alkoholen) zu NAD⁺ katalysiert. PMS (Phenazinmethosulfat) koppelt dann Elektronenübertragung zwischen NADH und einem Tetrazoliumbromid-Farbstoff (MTT, 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid), welcher einen Niederschlag in dem Gel bildet. Nach einigen Stunden bis über Nacht Tränken in den Substraten werden die Gele gewaschen, um Reagenzien und löslichen Farbstoff zu entfernen. Bei Banden auf dem Gel, wo es eine aktive Dehydrogenase gibt, bildet sich ein unlöslicher blauer Farbstoff. Verschiedene Aspekte des Assays sind von Johnson und Lin beschrieben worden (J. Bacteriol. 169: 2050 (1987)).

Reinigung und Identifizierung nicht-spezifischer katalytischer Aktivität in *E. coli*

[0220] Eine teilweise Reinigung von nicht-spezifischer katalytischer Aktivität in großem Maßstab wurde bei Zellen durchgeführt, die von dem Ende eines Durchlaufs einer typischen 1,3-Propandiol-Herstellung geerntet wurden, wie in dem verbesserten Verfahren unter Verwendung von KLP23/pAH48/pKP32 von Beispiel 7 beschrieben ist. Das Zellpellet (16 g) wurde gewaschen und dreimal in 20 ml von 50-mM-Hepes-Puffer, pH 7,5 resuspendiert. Die Zellen in der Suspension wurden durch Ultraschallbehandlung lysiert. Der zellfreie Extrakt wurde durch Zentrifugation (15 min, 20000 × g, 10°C) erhalten und der Überstand wurde durch Zugabe von 250 mg Protaminsulfat mit Rühren auf Eis weiter geklärt. Der Überstand, erhalten durch Zentrifugation (20 min, 20000 × g, 10°C), wurde durch Passage durch eine Säule Superdex[®] 200 präparativer Qualität (6 × 60 cm), äquilibriert mit Hepes-Puffer, fraktioniert. Fraktionen von jeweils 10 ml wurden gesammelt und ein Aliquot von jedem wurde vor dem Assay durch die Aktivitätsfärbung auf nativem Gel um das fünfundsanzigfache eingengt, wobei Centricon[®]-Membrane mit 10000 MW Rückhaltevermögen verwendet wurden. Die nicht-spezifische katalytische Aktivität wurde in den Fraktionen 107–112 und die Peak-Aktivität in den Fraktionen 108–109 identifiziert. Ein größeres Aliquot (jeweils 7 ml) der Fraktionen 108 und 109 wurde um das fünfzigfache eingengt und auf alle Bahnen eines nativen Gels mit 12 Bahnen aufgegeben. Das Gel wurde in der Hälfte geschnitten und eine Hälfte wurde für Dehydrogenase-Aktivität gefärbt, wo eine dunkelblaue Bande erschien, die die nicht-spezifische katalytische Aktivität darstellte. Das ungefärbte Gel wurde von oben nach unten mit dem gefärbten Gel ausgerichtet und eine Bande wurde auf dem ungefärbten Gel geschnitten, die der Bande der nicht-spezifischen katalytischen Aktivität entsprach. Der Gelstreifen wurde pulverisiert und lösliches Protein wurde durch Eintauchen der pulverisierten Teilchen in 0,5 ml von 2D-beladenem Puffer, Erhitzen auf 95°C für 5 min und Zentrifugation zur Entfernung der Gelteilchen extrahiert. Der Überstand wurde auf einen isoelektrisch fokussierenden (IEF) Streifen für 2-dimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) aufgegeben, wobei Bedingungen, beschrieben für 2D-PAGE von *E. coli*-Extrakten in der Swiss-2D-Datenbank (<http://www.expasy.ch/ch2d/>; Tonella et al., Electrophoresis 19: 1960–1971 (1998)), verwendet wurden. Das Gel wurde durch Elektroblothing auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde für Proteine unter Verwendung der Colloidal-blauen Gelfärbung gefärbt. Der gefärbte Blot, der verwendet wird, um die Identität der nicht-spezifischen katalytischen Aktivität zu erhalten, wird in [Fig. 6](#) gezeigt. Flecken wurden unter Verwendung von Standardtechniken für Aminoterminus-Peptid-Sequenzierung identifiziert. Nur ein einziger Flecken (Flecken A) codierte für eine Oxidoreductase-Aktivität. Neunzehn Zyklen von Flecken A ([Fig. 6](#)) ergaben eine Übereinstimmung mit 100%iger Identität durch das FASTA-Suchwerkzeug mit dem Aminoterminus von yqhD, einem offenen Leserahmen von *E. coli* mit mutmaßlicher Oxidoreductase-Aktivität. Die vollständige Aminosäu-

resequenz für das Protein, codiert durch yqhD, wird in SEQ ID NO:57 gegeben; die entsprechende DNA-Sequenz wird in SEQ ID NO:58 gegeben. Das yqhD-Gen hat 40% Identität mit dem Gen adhB in Clostridium, einer wahrscheinlichen NADH-abhängigen Butanol-Dehydrogenase 2.

Gendisruption von yqhD in E. coli KLP23:

[0221] Biochemische Assays und aminoterminaler Aminosäuresequenzierung ließen vermuten, daß nicht-spezifische katalytische Aktivität durch das E.-coli-yqhD-Gen codiert sein kann. Dieses Gen mit unbekannter Funktion codiert eine hypothetische Oxidoreductase und enthält zwei Alkohol-Dehydrogenase-Signaturen, die ebenfalls in der 1,3-Propandiol-Dehydrogenase von Citrobacter freundii und Klebsiella pneumoniae, codiert durch das dhaT-Gen, gefunden werden.

[0222] Um dieses Gen zu disruptieren, wurden yqhD und 830 bp von 5'-flankierender DNA-Sequenz und 906 bp von 3'-flankierender DNA-Sequenz aus genomischer DNA von E. coli KLP23 (Beispiel 4) in einer PCR amplifiziert, wobei Taq-Polymerase und die folgenden Primer verwendet werden:

(SEQ ID NO:59) 5'-GCGGTACCGTTGCTCGACGCTCAGGTTTTTCGG-3'

(SEQ ID NO:60) 5'-GCGAGCTCGACGCTTGCCCTGATCGAGTTTTGC-3'

[0223] Die Reaktion wurde bei 94°C für 1 min, 50°C für 1 min und 72°C für 3 min für 35 Zyklen, nachfolgend durch finale Extension bei 72°C für 5 min durchgeführt. Das resultierende 3,7-kb-DNA-Fragment wurde gereinigt, mit SacI und KpnI digestiert und mit ähnlich digestiertem pBluescriptII KS(+) (Stratagene) für 16 h bei 16°C ligiert. Die ligierte DNA wurde verwendet, um E. coli DH5α (Gibco/BRL) zu transformieren, und das erwartete Plasmid pJSP29, wurde aus einem Transformanten isoliert, der weiße Koloniefarbe auf LB-Agar (Difco), enthaltend X-gal (40 µg/ml) und Ampicillin (100 µg/ml), demonstrierte. Das Plasmid pJSP29 wurde mit AflII und NdeI digestiert, um ein 409-bp-DNA-Fragment, umfassend 363 bp des yqhD-Gens und 46 bp 3'-flankierende DNA-Sequenz, freizusetzen. Das verbliebene 5350-bp-DNA-Fragment wurde gereinigt und mit dem 1374-bp-AflII/NdeI-DNA-Fragment, enthaltend das Kanamycin-Resistenzgen aus pLoxKan2 (Genencor International, Palo Alto, CA), für 16 h bei 16°C ligiert. Die ligierte DNA wurde verwendet, um E. coli DH5α zu transformieren, und das erwartete Plasmid, pJSP32-Blue, wurde aus einem Transformanten, ausgewählt auf LB-Agarmedien, enthaltend Kanamycin (50 µg/ml), isoliert. Das Plasmid pJSP32-Blue wurde mit KpnI und SacI digestiert und die 3865-bp-yqhD-Disruptions-Kassette wurde gereinigt und mit ähnlich digestiertem pGP704 (Miller und Mekalanos, J. Bacteriol. 170: 2575–2583 (1988)) für 16 h bei 16°C ligiert. Die ligierte DNA wurde verwendet, um E. coli SY327 (Miller und Mekalanos, J. Bacteriol. 170: 2575–2583 (1988)) zu transformieren, und das erwartete Plasmid, pJSP32, wurde aus einem Transformanten, ausgewählt auf LB-Agarmedien, enthaltend Kanamycin (50 µg/ml), isoliert. Das Plasmid pJSP32 wurde in E. coli KLP23 transformiert und Transformanten wurden auf LB-Agar, enthaltend Kanamycin (50 µg/ml), ausgewählt. Von den gescreenten 200 Kanamycin-resistenten Transformanten demonstrierten zwei den Ampicillin-empfindlichen Phänotyp, der für ein Doppelcrossover-Rekombinationsereignis, resultierend in der Ersetzung des yqhD-Gens mit der yqhD-Disruptions-Kassette, erwartet wurde.

[0224] Die Disruption des yqhD-Gens wurde durch PCR unter Verwendung genomischer DNA, isoliert aus diesen zwei Transformanten, als dem Templat und der folgenden Gruppen von Primerpaaren bestätigt:

Gruppe # 1:

(SEQ ID NO:61) 5'-GCGAGCTCGACGCTTGCCCTGATCGAGTTTTGC-3'

(SEQ ID NO:62) 5'-CAGCTGGCAATTCCGGTTCG-3'

Gruppe #2:

(SEQ ID NO:63) 5'-CCCAGCTGGCAATTCCGGTTCGCTTGCTGT-3'

(SEQ ID NO:64) 5'-GGCGACCCGACGCTCCAGACGGAAGCTGGT-3'

Gruppe #3:

(SEQ ID NO:65) 5'-CCGCAAGATTCACGGATGCATCGTGAAGGG-3'

(SEQ ID NO:66) 5'-CGCCTTCTTGACGAGTTCTGAGCGGGA-3'

Gruppe #4:

(SEQ ID NO:67) 5'-GGAATTCATGAACAACCTTTAATCTGCACAC-3'

(SEQ ID NO:68) 5'-GTTTGAGGCGTAAAAAGCTTAGCGGGCGGC-3'

[0225] Die Reaktionen wurden unter Verwendung von entweder Expand High Fidelity Polymerase (Boehringer Mannheim) oder Platinum PCR Supermix, enthaltend Taq-Polymerase (Gibco/BRL), bei 94°C für 1 min, 50°C für 1 min und 72°C für 2 min für 35 Zyklen, gefolgt von einer finalen Extension bei 72°C für 5 min, durchgeführt. Die resultierenden PCR-Produkte wurden durch Gelelektrophorese in 1,0%iger (Gew./Vol.) Agarose analysiert. Die in Tabelle 8 zusammengefaßten Ergebnisse bestätigten Disruption des *yqhD*-Gens in beiden Transformanten.

TABELLE 8

Primer-Gruppe	Erwartete Größe (bp)		Beobachtete Größe
	<i>yqhD</i> -Disruption	<i>yqhD</i> -Wildtyp	
1	1200	kein Produkt	~ 1200
2	1266	kein Produkt	~ 1266
3	2594	kein Produkt	~ 2594
4	kein Produkt	1189	~ 900

[0226] Die *yqhD*-Disruption deletiert das 3'-Ende von *yqhD*, einschließlich 46 bp von 3'-flankierender intergenischer DNA-Sequenz. Die Deletion entfernt 363 bp von 3'-*yqhD*-Codierungssequenz, entsprechend 121 Aminosäuren. Ein Stopcodon ist 15 bp stromabwärts von der verbleibenden *yqhD*-Codierungssequenz in der Kanamycinresistenz-Kassette vorhanden.

[0227] Die Plasmide pAH48 und pKP32 wurden in *E. coli* KLP23 cotransformiert (*yqhD*⁻) und beide Plasmide enthaltende Transformanten wurden auf LB-Agar, enthaltend Ampicillin (100 µg/ml) und Spectinomycin (50 µg/ml), ausgewählt. Ein repräsentativer Transformant wurde auf seine Fähigkeit getestet, Glucose in 10-l-Fermentationen entweder in Anwesenheit oder in Abwesenheit von Vitamin B₁₂ in 1,3-Propandiol umzuwandeln.

Demonstration, daß *yqhD* für wesentliche 1,3-Propandiol-Herstellung in dem *E.-coli*-Stamm KLP23/pAH48/pKP32 erforderlich ist:

[0228] Fermentationen für die Herstellung von 1,3-Propandiol wurden, im wesentlichen wie in Beispiel 7 beschrieben, mit dem *E.-coli*-Stamm KLP23 (*yqhD*⁻)/pAH48/pKP32 durchgeführt, um die Auswirkung der *yqhD*-Disruption auf die 1,3-Propandiol-Herstellung zu testen.

[0229] Eine repräsentative 10-l-Fermentation unter Verwendung des Knockout der nicht-spezifischen katalytischen Aktivität, *E.-coli*-Stamm KLP23 (*yqhD*⁻)/pAH48/pKP32, wird in Tabelle 9 gezeigt. Der Organismus sammelte bis zu der Zugabe von Vitamin B₁₂, wenn die OD₅₅₀ 30 A überschritt (10,4 h), andauernd Zellmasse und Glycerol an. Vitamin B₁₂ wurde als Bolus-Zugabe von 8 mg nach 10,4 h hinzugegeben und danach wurde Vitamin B₁₂ kontinuierlich mit einer Geschwindigkeit von 1,32 mg/h zugeführt. In den 4 h, die der B₁₂-Zugabe folgten, verlangsamte sich der Glucose-Verbrauch, die Rate der Sauerstoffnutzung fiel ab, und es gab keine weitere Zunahme in der optischen Dichte. Die Fermentation von Glucose hörte auf, und die Glucosekonzentration in dem Tank sammelte sich an. Der höchste Titer von 1,3-Propandiol, der erhalten wurde, war 0,41 g/l. Der Organismus wurde auf seine Lebensfähigkeit überprüft, indem eine Verdünnungsserie der Zellen auf Agarplatten, enthaltend Ampicillin und Spectinomycin, plattiert wurde. Die Platten wurden für 24 h in einem 30°C-Inkubator inkubiert. Es gab aus der Fermentation von *E. coli* KLP23 (*yqhD*⁻)/pAH48/pKP32 keine lebensfähigen Kolonien auf der Platte, Tabelle 11.

[0230] Im Gegensatz dazu für die Zellsuspension aus einem Kontrolltank, in welchen kein Vitamin B₁₂ gegeben worden war, fort, Zellmasse und Glycerol anzuhäufen, bis der 10-l-Tank aufgrund der vollständigen Zugabe der Glucosezufuhrlösung voll war (Tabelle 10). Eine Bestimmung der Lebensfähigkeit auf der Agarplatte durch Verdünnungsserie der Zellsuspension am Ende dieser Fermentation zeigte eine Zahl an lebensfähigen Zellen, die übereinstimmend mit der Gesamtzellzahl, geschätzt durch den Wert der optischen Dichte, war (Tabelle 11).

TABELLE 9: ZUSAMMENFASSUNG DER REPRÄSENTATIVEN FERMENTATION DER FEHLGESCHLAGENEN UMWANDLUNG VON GLUCOSE IN 1,3-PROPANDIOL (1,3-PD) UNTER VERWENDUNG DES E.-COLI-STAMMES KLP23(YQHD⁻)/PAH48/PKP32.

Zeit (h)	OD ₅₅₀ (AU)	DO (%)	Glucose (g/l)	Glycerol (g/l)	1,3 PD (g/l)
0	0,4	150	11,3	0,05	0
2,3	3,0	134	10,7	0,13	0
4,3	10,8	85,0	8,2	1,41	0
8,3	23,1	81,8	0,9	10,0	0
16,3	37,2	149	13,1	21,4	0,41
18,3	47,6	149	18,9	21,6	0,39
20,3	39,6	149	24,4	22,3	0,42
23,8	33,6	149	25,4	22,0	0,41

TABELLE 10: ZUSAMMENFASSUNG DER REPRÄSENTATIVEN FERMENTATION DER UMWANDLUNG VON GLUCOSE IN GLYCEROL UNTER VERWENDUNG DES E.-COLI-STAMMES KLP23(YQHD⁻)/PAH48/PKP32.

Zeit (h)	OD ₅₅₀ (AU)	DO (%)	Glucose (g/l)	Glycerol (g/l)
0	0,2	148	9,5	0,06
2,2	2,8	128	8,9	0,13
4,2	10,4	58,5	7,0	1,4
8,2	21,6	57,6	2,7	11,2
16,2	76,8	10,7	0	40,5
20,2	117	10,2	0	52,9
23,7	154	8,5	0	63,9
36,2	239	10,1	0,1	122

TABELLE 11: REPRÄSENTATIVE ZUSAMMENFASSUNG VON ZÄHLUNGEN DER LEBENSFÄHIGKEIT AUF DER PLATTE AUS ENDPUNKTEN VON FERMENTATIONEN VON GLUCOSE UNTER VERWENDUNG DES E.-COLI-STAMMES KLP23(YQHD⁻)/PAH48/PKP32 IN ABWESENHEIT UND ANWESENHEIT VON VITAMIN B₁₂.

Vitamin B ₁₂	Zeit (h) am Endpunkt	OD ₅₅₀ (AU)	Lebendkeimzahl (cfu/ml)
nein	36,2	239	2.1E11
ja	23,8	33,6	0
ja	23,8	41,2	0

SEQUENZAUF LISTUNG

<110> E.I. du Pont de Nemours and Company

<120> Verbessertes Verfahren für die biologische Herstellung von 1,3-Propandiol mit hohem Titer

<130> BC1020 PCT

<140>

<141>

<150> 60/149,534

<151> 1999-08-08

<160> 68

<170> Microsoft Office 97

<210> 1

<211> 12145

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 1

gtcgaccacc	acggtggtga	ctttaatgcc	gctctcatgc	agcagctcgg	tggcgggtctc	60
aaaattcagg	atgtcgccgg	tatagttttt	gataatcagc	aagacgcctt	cgccgccgctc	120
aatttgcatc	gcgcatcaca	acattttgtc	cgcgctcggc	gaggtgaata	tttccccggg	180
acaggcgccc	gagagcatgc	cctggccgat	atagcccgag	tgcatcgggt	catgtccgct	240
gccgccgccc	gagagcaggg	ccacctgcc	agccaccggc	gcgtcgggtc	gggtcacata	300
cagcgggtcc	tgatgcaggg	tcagctgccc	atgggcttta	gccagcccct	gtaattgttc	360
attcagtaca	tottcaaac	ggttaatcag	ctttttcatt	attcagtgct	ccgttgagaga	420
aggttcagat	ccgcctctct	gctggcggag	gcggtcatcg	cgtaggggta	tcgtctgacg	480
gtggagcgtg	cctggcgata	tgatgattct	ggctgagcgg	acgaaaaaaa	gaatgccccg	540
acgatcgggt	ttcattacga	aacattgctt	cctgattttg	tttctttatg	gaacgttttt	600
gctgaggata	tggtgaaaat	gcgagctggc	gcgctttttt	tcttctgcca	taagcggcgg	660
tcaggatagc	cggcgaaagc	ggtgggaaaa	aattttttgc	tgattttctg	ccgactgccc	720
gagaaaagc	ggtcaaacac	ggaggattgt	aagggcatta	tgcgcaaacg	gagcggatcg	780
ggatcgcaat	cctgacagag	actagggttt	ttgtttccaa	tatggaacgt	aaaaaattaa	840
cctgtgtttc	atatcagaac	aaaaagcgga	aagatttttt	tgttccctgc	cggccctaca	900
gtgatcgcac	tgctccggta	cgctccgttc	aggccgcgct	tcactggccc	gcgcggataa	960
cgcaggggct	catcatgtct	acatgcgcac	ttatttgagg	gtgaaaggaa	tgctaaaagt	1020
tattcaatct	ccagccaaat	atcttcaggg	tcctgatgct	gctgttctgt	tcggtcaata	1080
tgccaaaaac	ctggcggaga	gcttcttcgt	catcgctgac	gatttcgtaa	tgaagctggc	1140
gggagagaaa	gtggtgaatg	gcctgcagag	ccacgatatt	cgctgccatg	cggaacgggt	1200
taacggcgaa	tgacgcagat	cggaaatcaa	ccgctgatg	gcgattttgc	aaaaacaggg	1260
ctgcccgccc	gtggtcggga	tcggcgggtg	taaaaccctc	gataaccgga	aggcagtcgg	1320
ttactaccag	aagctgcccg	tggtggtgat	cccgaccatc	gcctcgaccg	atgcgccaac	1380
cagcgcgctg	tcggtgatct	acaccgaagc	gggcgagttt	gaagagtatc	tgatctatcc	1440
gaaaaaccgg	gatatggtgg	tgatggacac	ggcgattatc	gccaaaagcg	cggtacgcct	1500
gctggtctcc	ggcatggggc	atgcgctctc	cacctggttc	gaggcctaac	cttgcctaca	1560
tgccgcgccc	accagcatgg	ccggaggaca	gtccaccgag	gcggcgctga	gcctcgcccc	1620
cctgtgctat	gatacgctgc	tgccggaggg	cgaaaaggcc	cgctcggcgg	cgcaggccgg	1680
ggtagtgacc	gaagcgctgg	agcgcacatc	cgaggcgaac	acttacctca	gcggcattgg	1740
ctttgaaagc	agtggcctgg	ccgctgcccc	tgcaatccac	aacggtttca	ccattcttga	1800
agagtgccat	cacctgtatc	acggtgagaa	agtggccttc	ggtaccctgg	cgcagctggt	1860
gctgcagaa	agcccgatgg	acgagattga	aacggtgcag	ggctctgccc	agcgcgctcg	1920
cctgccggtg	acgctcggc	agatgggctg	caaagagggg	atcgacgaga	aaatcgcccc	1980
ggtggcgaaa	gctacctgcg	cggaaagggg	aacctccat	aatatgccgt	ttgcgggtgac	2040
cccgttaagc	gtcctgccc	tatcctcac	cccgatctg	ttaggccagc	agtggctggc	2100
gcgtgaaatc	gcggtgctca	aaccgctggc	ccaggtcagc	ggtttttctt	tctcccctcc	2160
ggcagtcgct	gcccggaggg	ttctctatgg	tacaacgcgg	aaaaggatat	gactgttcag	2220
actcaggata	ccgggaaggc	ggtctcttcc	gtcattgccc	agtcattggca	ccgctgcagc	2280
aagtttatgc	agcgcgaaac	ctggcaaacg	ccgcaccagg	cccaggccct	gaccttcgac	2340

tccatctgtc	ggcgtaaaac	cgcgctgctc	accatcggcc	aggcggcgct	ggaagacgcc	2400
tgggagttta	tggacggccg	cccctgcgcg	ctgtttatc	ttgatgagtc	cgcctgcac	2460
ctgagccgtt	gcgccgagcc	gcaaaccctg	gccagctgg	ctgccctggg	atctcgcgac	2520
ggcagctatt	gtgcggagag	cattatcggc	acctgcgcgc	tgtcgttggc	cgcgatgcag	2580
ggccagccga	tcaacaccgc	cgccgatcgg	cattttaagc	aggcgtaca	gccatggagt	2640
ttttgctcga	cgccggtgtt	tgataaccac	ggcggctgt	tccgctctat	ctcgttttgc	2700
tgtctggtcg	agcaccagtc	cagcggcgac	ctctccctga	cgctggccat	cgcccgcgag	2760
gtgggtaact	ccctgcttac	cgacagcctg	ctggcggaat	ccaaccgtca	cctcaatcag	2820
atgtacggcc	tgetggagag	catggacgat	gggtgatgg	cgtggaacga	acagggcggtg	2880
ctgcagtttc	tcaatgttca	ggcggcgaga	ctgctgcac	ttgatgctca	ggccagccag	2940
gggaaaaata	tcgccgatct	ggtgaccctc	cgggcgctgc	tgcgcgcgc	catcaaacac	3000
gcccgcggcc	tgaatcacgt	cgaaagtc	ttttaaagtc	agcatcagtt	tgtcgatgcg	3060
gtgatcacct	taaaaccgat	tgtcgaggcg	caaggcaaca	gttttattct	gctgctgcat	3120
ccggtggagc	agatgcccga	gctgatgacc	agccagctcg	gtaaagttag	ccacaccttt	3180
gagcagatgt	ctgccgacga	tccggaaaacc	cgacgcctga	tccactttgg	ccgccaggcg	3240
gcgcgcggcg	gcttcccggg	gctactgtgc	ggcgaagagg	gggtcgggaa	agagctgctg	3300
agccaggcta	ttcacaatga	aagcgaaccg	gcgggcggcc	cctacatctc	cgtaactgac	3360
cagctatatg	ccgacagcgt	gctgggcccag	gactttatgg	gcagcgcccc	taccgacgat	3420
gaaaatggtc	gcctgagccg	ccttgagctg	gccaacggcg	gcacctgtt	tctggaaaag	3480
atcgagtate	tggcgcggga	gctgcagctg	gctctgctgc	aggtgattaa	gcagggcggtg	3540
ctaccccgc	tcgacgcccg	gcgccctgat	ccggtggatg	tgaagtgat	tgccaccacc	3600
accgtcgatc	tggccaatct	ggtggaacag	aaccgcttta	gcccagct	gtactatgcg	3660
ctgcaactct	ttgagatcgt	catcccgcgc	ctgcgcgcc	gacgcaacag	tattccgctg	3720
ctggtgcata	accggttgaa	gagcctggag	aagcgtttct	cttcgcgact	gaaagtggac	3780
gatgacgcgc	tggcacagct	ggtggcctac	tcgtggcccg	ggaatgattt	tgagctcaac	3840
agcgtcattg	agaatatcgc	catcagcagc	gacaacggcc	acattcgct	gagtaactctg	3900
ccggaatate	tctttccga	gcgccggg	gggatagcg	cgatcagct	gctgccggcc	3960
agcctgactt	ttagcgcct	cgaaaaggaa	gctattatc	acgcccggcg	ggtgaccagc	4020
ggcggggtgc	aggagatgtc	gcagctgctc	aatctggcc	gcaccacctc	gtggcgcaaa	4080
atgaagcagt	acgatattga	gcccagccag	ttcaagcga	agcatcaggc	ctagtctctt	4140
cgattcgcgc	catggagaac	agggcatccg	acaggcgatt	gctgtagcgt	ttgagcgcgt	4200
cgcgacggcg	atgcccgcgg	tccatggccg	tcagcaggcg	ttcgagccga	cgggactggg	4260
tgcgcgccac	gtgcagctgg	gcagaggcga	gattcctccc	cgggatcacg	aactgtttta	4320
acgggcccgt	ctcggccata	ttgcccgtga	taagccgctc	cagggcggtg	atctctctct	4380
gcgccagctg	ctggtcagg	cggtcaggc	cccgcgcatc	gctggccagt	tcagccccta	4440
gcacgaacag	cgtctgctga	atatggtgca	cctttcccgc	cagcccggcg	tcgcccgtcg	4500
tggcgtagca	gacgcccagc	tgggatata	gttcacgac	ggtgccgtag	gcctcgacgc	4560
gaatatggtc	tttctcgatg	cggtgcccgc	cgtaacgggc	ggtggtgcct	ttatcccggg	4620
tgcgggtata	gatacgatac	attcagtttc	tctcacttaa	cgccaggact	ttaaccagct	4680
gcccggcggt	ggcggccgagc	gtacgcagtt	gatcgtcgt	atcggtgacg	tgtcccgtag	4740
ccagcggcgc	agcccgcggc	agctgggcat	gagtgagggc	tatctcgccg	gacgcgctga	4800
gcccgatacc	caccgcagg	ggcgagcttc	tggcccggcg	ggcggccagc	gcagcggcgt	4860
caccgcctcc	gtcataggtt	atggtctggc	aggggacccc	ctgctcctcc	agccccagc	4920
acagctcatt	gatggcggcg	gcatggtgcc	cgccgggatc	gtaaaacagg	cgtaaccctg	4980
gcgggtgaaag	cgacatgacg	gtcccctcgt	taaacactcag	aatgcctggc	ggaaaatcgc	5040
ggcaatctcc	tgetcgttgc	ctttacgcgg	gttcgagaac	gcattgcccgt	cttttagagc	5100
catctccgcc	atgtagggga	agtcggcctc	ttttaccccc	agatcgcgga	gatgctgcgg	5160
aataccgata	tccatcgaca	gacgcgtgat	agcggcgatg	gctttttccg	ccgcgtcgag	5220
agtggacagt	ccggtgatat	tttcgcccac	cagttcagcg	atatcggcga	atctctccgg	5280
gttggcgatc	aggttgtagc	gcccacatg	cgccagcagg	acagcgttgg	ccacgcccgtg	5340
cgccatgtcg	tacagccgc	ccagctggtg	cgccatggcg	tgacagtagc	cgaggttggc	5400
gttattgaaa	gcccctccgg	ccagcagaga	agcataggcc	atgttttccc	gcgcctgcag	5460
attgctgccc	agggccacgg	cctggcgcag	gttgcgggcg	atgagccgga	tcgcctgcat	5520
ggcggcgccg	tccgtcaccg	ggttagcgtc	tttggagata	taggcctcta	cgccgtgggt	5580
cagggcatcc	atcccggctg	ccgcggtcag	ggcggccggg	ttaccgatca	tcagcagtg	5640
atcgttgata	gagaccgacg	gcagtttgcg	ccagctgacg	atcaaaact	tcactttggt	5700
ttcgggtgtg	gtcaggacgc	agtggcgggt	gacctcgtg	gcggtgccgg	cggtggtatt	5760
gaccgcgacg	ataggcggca	gcccgttggg	caggtctcgc	attccggcat	actggtacag	5820
atccccccta	tgggtggcgg	cgatgccgat	gcctttgccg	caatcgtgcg	ggctgccgc	5880
gcccacgggtg	acgatgatgt	gcactgttc	ggcggcaaac	acggcgaggc	cgtcgcgcac	5940
gttggtgtct	ttcgggttcg	gctcgacgcc	gtcaaagatc	gccacctcga	tcccggcctc	6000
ccgcagataa	tgagggttt	tgtccaccgc	gccatcttta	attgcccgca	ggcctttgtc	6060
ggtgaccagc	agggctttt	tcccccccag	cagctggcag	cgttcgcgga	ctacggaaat	6120
ggcgttgggg	ccaaaaaagt	taacgtttgg	caccagataa	tcaaacatac	gatagctcat	6180

aatatacctt	ctcgccttcag	gttataatgc	ggaaaaacaa	tccagggcgc	actgggctaa	6240
taattgatcc	tgctcgaccg	tacggccgct	aacggccgacg	gcgccaatta	cctgctcatt	6300
aaaaataact	ggcaggcccg	cgccaaaaat	aataattcgc	tggtggttg	ttagctgcag	6360
accgtacaga	gattgtcctg	gctggaccgc	tgacgtaatt	tcatgggtac	cttgcttcag	6420
gctgcaggcg	ctccaggcct	tattcagga	aatatcgag	ctggagacga	aggcctcgtc	6480
catccgctgg	ataagcagcg	tggtgcctcc	gcggtcaact	acggaaaaca	ccaccgccac	6540
gttgatctca	gtggcttttt	tttccaccgc	cgccgccatt	tgctgggagg	cgccagggt	6600
gattgtctga	acttggtggc	tcttgttcat	cattctctcc	cgcaccagga	taacgctggc	6660
gcgaatagtc	agtagggggc	gatagtaaaa	aactattacc	attcggttg	cttgctttat	6720
ttttgtcagc	gttattttgt	cgcccgccat	gatttagtca	atagggttaa	aatagcgtcg	6780
gaaaaacgta	attaagggcg	ttttttatta	attgatttat	atcattgagg	gcgatcacat	6840
tttttatttt	ttccgcccga	gtaaagtttc	atagtgaac	tgctggtaga	ttcgtgtgc	6900
caaattgaaa	cgaaattaaa	tttatttttt	tcaccactgg	ctcattttaa	gttccgctat	6960
tgccggtaat	ggccggggcg	caacgacgct	ggcccggcgt	attcgtacc	gtctgaggat	7020
ttcacctttt	gagccgatga	acaatgaaaa	gatcaaaaacg	atttgacagta	ctggcccagc	7080
gccccgtcaa	tcaggacggg	ctgattggcg	agtggcctga	agaggggctg	atcgccatgg	7140
acagcccctt	tgaccggctg	tcttcagtaa	aagtggacaa	cggtctgatc	gtcgaactgg	7200
acggcaaacg	ccggaccgag	tttgacatga	tcgaccgatt	tatcgccgat	tacggatca	7260
acgttgagcg	cacagagcag	gcaatgcgcc	tggaggcggt	ggaaatagcc	cgtatgctgg	7320
tggatattca	cgctcagccg	gaggagatca	ttgccatcac	taccgccatc	acgcccggca	7380
aagcggctga	ggtgatggcg	cagatgaacg	tggtggagat	gatgatggcg	ctgcagaaga	7440
tgcgtgcccc	ccggaccccc	tccaaccagt	gccacgtcac	caatctcaaa	gataatccgg	7500
tgacagattg	cgctgacgcc	gccgaggccg	ggatccgcgg	cttctcagaa	caggagacca	7560
cggtcgggat	cgccgcctac	gcgcccgtta	acgcccggc	gctgttggtc	ggttcgcagt	7620
cgggcccggc	cgccgtgttg	acgcagtgct	cggtggaaga	ggccaccgag	ctggagctgg	7680
gcatgctgg	cttaaccagc	tacgccgaga	cggtgtcgg	ctacggcacc	gaagcgggat	7740
ttaccgacgg	cgatgatacg	ccgtggtcaa	aggcgttct	cgctcggcc	tacgcctccc	7800
gcgggttgaa	aatgcgctac	acctccggca	ccggatccga	agcgtgatg	ggctattcgg	7860
agagcaagtc	gatgctctac	ctcgaatcgc	gctgcatctt	cattactaaa	ggcgcgggg	7920
ttcaggggact	gcaaaacggc	gcggtagct	gtatcggcat	gaccggcgt	gtgccgtcgg	7980
gcattcgggt	ggtctggcg	gaaaaactga	tcgctctat	gctcgacctc	gaagtggcgt	8040
ccgccaacga	ccagactttc	tcccactcgg	atattcggcg	caccgcgcgc	accctgatgc	8100
agatgctgcc	gggcaccgac	tttattttct	ccggctacag	cgcggtgccg	aactacgaca	8160
acatgttcgc	cggtctgaac	ttcgatgcgg	aagattttga	tgattacaac	atcctgcagc	8220
gtgacctgat	ggttgacggc	ggcctgcgtc	cggtgaccga	ggcggaaacc	attgccattc	8280
gccagaaaagc	ggcgcggggc	atccaggcgg	ttttccgca	gctggggctg	ccgccaatcg	8340
ccgacgagga	ggtggaggcc	gccacctacg	cgcacggcag	caacgagatg	ccgcccgtga	8400
acgttggtga	ggatctgagt	gcggtggaag	agatgatgaa	gcgcaacatc	accggcctcg	8460
atattgtcgg	cgcgctgagc	cgcacggcgt	ttgaggatat	cgccagcaat	attctcaata	8520
tgctgcgcca	gcgggtcacc	ggcgattacc	tgacagctc	ggccattctc	gatcggcagt	8580
tcgaggtggt	gagtgcggtc	aacgacatca	atgactatca	ggggccgggc	accggctatc	8640
gcatctctgc	cgaaacgctg	gcggagatca	aaaatattcc	gggcgtggtt	cagcccagaca	8700
ccattgaata	aggcggattt	cctgtgcaac	agacaaccca	aattcagccc	tcttttacc	8760
tgaaaaccgg	cgagggcggg	ctagctctcg	ccgatgaacg	cgccgatgaa	gtgggtgatcg	8820
gcgtcggccc	tgctctcgat	aaacaccagc	atcacactct	gatcgatatg	ccccatggcg	8880
cgatcctcaa	agagctgatt	gccgggggtg	agaagagggg	gcttcacgcc	cggggtggtc	8940
gcattctgcg	cacgtccgac	gtctccttta	tggcctggga	tgccggccaac	ctgagcggct	9000
cggggatcgg	catcggtatc	cagtccaagg	ggaccacggg	catccatcag	cgcatctgc	9060
tggcgtcag	caacctggag	ctgttctccc	aggcgccgct	gctgacgctg	gagacctacc	9120
ggcagattgg	caaaaacgct	cgcgctatg	cgcgcaaaaga	gtcaccttcg	ccgggtgccg	9180
tggtgaacga	tcagatggtg	cgcccgaaat	ttatggccaa	agccgcgcta	tttcatatca	9240
aagagaccaa	acatgtggtg	caggacgcgg	agcccgtcac	cctgcacatc	gacttagtaa	9300
gggagtgacc	atgagcgaga	aaaccatgcg	cgtgcaggat	tatccgttag	ccaccgctg	9360
cccggagcat	atcctgacgc	ctaccggcaa	accattgacc	gatattacc	tcgagaagg	9420
gctctctggc	gaggtgggcc	cgcaggatgt	gcgatctcc	cgccagacc	ttgagtacca	9480
ggcgcagatt	cccagcgaga	tgacgcgcca	tgccgtggcg	cgcaatttcc	gcccgcgggc	9540
ggagcttatc	gccattctcg	acgagcgcat	tctggctatc	tataacgcgc	tgcccccgtt	9600
ccgctcctcg	caggcggagc	tgctggcgat	cgccgacgag	ctggagcaca	cctggcatgc	9660
gacagtgaat	gccgcctttg	tccgggagtc	ggcggaaagt	tatcagcagc	ggcataagct	9720
gcgtaaagga	agctaagcgg	aggtcagcat	gccgttaata	gccgggattg	atatcggcaa	9780
cgccaccacc	gaggtggcgc	tgccgtccga	ctaccgcag	gcgagggcgt	ttgttgccag	9840
cggtatcgtc	gcgacgacgg	gcataaaaag	cacgcgggac	aatatcgccg	ggaccctcgc	9900
cgcgctggag	caggccctgg	cgaaaacacc	gtggctgatg	agcagatgct	ctcgcatcta	9960
tcttaacgaa	gccgcggccg	tgattggcga	tggtggcgatg	gagaccatca	ccgagacct	10020

tatcaccgaa	tcgaccatga	tcggtcataa	cccgcagacg	ccgggcgggg	tggggcgttg	10080
cgtggggacg	actatcgccc	tcgggaggct	ggcgacgctg	ccggcggcgc	agtatgccga	10140
ggggtggatc	gtactgattg	acgacgccc	cgatttcctt	gacgcccgtg	ggtggctcaa	10200
tgaggcgcctc	gaccggggga	tcaacgtggt	ggcggcgatc	ctcaaaaagg	acgacggcgt	10260
gctggtgaac	aaccgcctgc	gtaaaaccct	gccggtggtg	gatgaagtga	cgctgctgga	10320
gcaggtcccc	gagggggtaa	tggcggcggt	ggaagtggcc	gcgcccggcc	aggtggtgcg	10380
gatcctgtcg	aatccctacg	ggatcgccac	cttcttcggg	ctaagcccgg	aagagaccca	10440
ggccatcgtc	cccacgccc	gcgccctgat	tggcaaccgt	tccgcggtgg	tgctcaagac	10500
cccgcagggg	gatgtgcagt	cgcgggtgat	cccggcgggc	aacctctaca	ttagcggcga	10560
aaagcggcgc	ggagaggccg	atgtcgccga	gggcgcggaa	gccatcatgc	aggcgatgag	10620
cgcttgcgct	ccggtacgcg	acatccgcg	cgaaccgggc	acccacgccc	gcggcatgct	10680
tgagcgggtg	cgcaaggtaa	tggcgtccct	gaccggccat	gagatgagcg	cgatatacat	10740
ccaggatctg	ctggcgggtg	atacgtttat	tccgcgcaag	gtgcagggcg	ggatggccgg	10800
cgagtgcgcc	atggagaatg	ccgtcgggat	ggcggcgatg	gtgaaagcgg	atcgtctgca	10860
aatgcaggtt	atcgcccgcg	aactgagcgc	ccgactgcag	accgaggtgg	tgggtggcgg	10920
cgtggaggcc	aacatggcca	tcgcccgggg	gttaaccact	cccggctgtg	cggcgcccgt	10980
ggagtcctc	gacctcgcg	ccggctcgac	ggatgcggcg	atcgtcaacg	cggaggggca	11040
gataacggcg	gtccatctcg	ccggggcggg	gaatatggtc	agcctgttga	ttaaaaccga	11100
gctgggcctc	gaggatcttt	cgctggcgga	agcgataaaa	aaatacccgc	tggccaaagt	11160
ggaaagcctg	ttcagtattc	gtcacgagaa	tggcgcggtg	gagttctttc	gggaagccct	11220
cagcccggcg	gtgttcgcca	aagtgggtga	catcaaggag	ggcgaactgg	tgccgatcga	11280
taacgccagc	ccgctggaaa	aaattcgtct	cgtgcgccgg	caggcgaaag	agaaagtgtt	11340
tgtcaccaac	tgctgcgcg	cgctgcgcca	ggtctcacc	ggcggttcca	ttcgcgatat	11400
cgctttgtg	gtgctgggtg	gaggctcatc	gctggacttt	gagatcccgc	agcttatcac	11460
ggaagccttg	tcgcaactatg	gcgtggtcgc	cgggcagggc	aatattcggg	gaacagaagg	11520
gccgcgcaat	gcggtcgcca	ccgggctgct	actggccggg	caggcgaatt	aaacgggcgc	11580
tcgcgccagc	ctctctcttt	aacgtgctat	ttcaggatgc	cgataatgaa	ccagacttct	11640
accttaaccg	ggcagtgcgt	ggcccagttt	cttggcaccg	gattgctcat	tttcttcggc	11700
cggggctgcg	tcgctgcgct	gcgggtcgcc	ggggccagct	ttggtcagtg	ggagatcagt	11760
attatctggg	gccttggcgt	cgccatggcc	atctacctga	cggccggtgt	ctccggcgcg	11820
cacctaaatc	cggcgggtgac	cattgcctctg	tggctgttcg	cctgttttga	acgcccgaag	11880
gtgctgcccgt	ttattgttgc	ccagacggcc	ggggccttct	gcgcccgcgc	gctggtgtat	11940
gggctctatc	gccagctggt	tctcgatctt	gaacagagtc	agcataatcgt	gcgcccgcact	12000
gccgccagtc	ttaacctggc	cggggtcttt	tccacgtacc	cgcatccaca	tatcactttt	12060
atacaagcgt	ttgccgtgga	gaccaccatc	acggcaatcc	tgatggcgat	gatcatggcc	12120
ctgaccgacg	acggcaacgg	aattc				12145

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Unbekannt

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 2

gctttctgtg ctgccccttt ag 22

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 3

tggtcgagga tccactcac ttt 23

<210> 4

<211> 51

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> primer

<400> 4

aaagtgaagt ggatcctcga ccaattggat ggtggcgcag tagcaaacaa t 51

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 5

ggatcaccgc cgcagaaact acg 23

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 6

ctgtcagccg ttaagtgtc ctgtg 25

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 7
cagttcaacc tgttgatagt acg 23

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

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

<220>
<223> Primer

<400> 8
atgagtcaaa catcaacctt 20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

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

<220>
<223> Primer

<400> 9
atggagaaaa aaatcactgg 20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

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

<220>
<223> Primer

<400> 10
ttacgccccg ccctgccact 20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

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

<220>
<223> Primer

<400> 11
tcagaggatg tgcacctgca 20

<210> 12
<211> 26
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

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

<220>
<223> Primer

<400> 12
cgagcatgcc gcattggca ctactc 26

<210> 13
<211> 29
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

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

<220>
<223> Primer

<400> 13
gcgctagag taggttattc ccactcttg 29

<210> 14
<211> 26
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

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

<220>
<223> Primer

<400> 14
gaagtcgacc gctg'gcctt atccgg 26

<210> 15
<211> 28
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

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

<220>
<223> Primer

<400> 15
cgcgtcgacg ttacaattt caggtggc 28

<210> 16
<211> 23

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 16

gcagcatgct ggactggtag tag 23

<210> 17

<211> 27

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 17

cagtctagag ttattggcaa acctacc 27

<210> 18

<211> 25

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 18

gatgcatgcc cagggcggag acggc 25

<210> 19

<211> 29

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 19

ctaacgatfg ttctctagag aaaatgtcc 29

<210> 20

<211> 30

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 20

cacgcatgca gtccaacctg ttgatagtac 30

<210> 21

<211> 28

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 21

gcgtctagat cctttaaataaaaaatg 28

<210> 22

<211> 51

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 22

gcgcggatcc aggagtctag aattatggga tgactacta aacctctatc t 51

<210> 23

<211> 36

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 23

gatacgcccg ggttaccatt tcaacagatc gtcctt 36

<210> 24

<211> 34

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 24

ttgataatat aacctggct gctgctgctg atag 34

<210> 25

<211> 39

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 25

gtatgatatg ttatcttgga tccaataaat ctaatcttc 39

<210> 26

<211> 24

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 26

catgactagt aaggaggaca attc 24

<210> 27

<211> 24

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 27

catggaattg tctccttac tagt 24

<210> 28

<211> 19

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 28
ctagtaagga ggacaattc 19

<210> 29
<211> 19
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

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

<220>
<223> Primer

<400> 29
catggaattg tctcctta 19

<210> 30
<211> 15
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

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

<220>
<223> Primer

<400> 30
gatccaggaa acaga 15

<210> 31
<211> 15
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

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

<220>
<223> Primer

<400> 31
ctagtctggt tcttg 15

<210> 32
<211> 94
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

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

<220>
<223> Terminatorsequenz

<400> 32

agcttaggag tctagaatat tgagctcgaa ttcccgggca tgcggtaccg gatccagaaa 60
 aaagcccga cctgacagtg cgggcttttt tttt 94

<210> 33

<211> 37

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 33

ggaattcaga tctcagcaat gagcgagaaa accatgc 37

<210> 34

<211> 27

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 34

gctctagatt agcttccttt acgcagc 27

<210> 35

<211> 33

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 35

ggccaagctt aaggaggta attaaatgaa aag 33

<210> 36

<211> 26

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 36

gctctagatt attcaatggt gtcggg

26

<210> 37

<211> 42

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 37

gcgccgicta gaattatgag ctatcgtatg ttgattatc tg 42

<210> 38

<211> 36

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 38

tctgatcgg gatcctcaga atgcctggcg gaaaat 36

<210> 39

<211> 18

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Linker

<220>

<223> Linker

<400> 39

tcgacgaatt caggagga 18

<210> 40

<211> 18

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Linker

<220>

<223> Linker

<400> 40

ctagtctctc tgaattcg 18

<210> 41
 <211> 4549
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: pCL1920

<220>
 <223> Plasmid

<400> 41

```

agctcgtcag cgggtgttgg cgggtgtcgg ggctggctta actatgcggc atcagagcag 60
attgtactga gagtgacca tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa 120
taccgcatca ggcgccattc gccattcagg ctgcgcaact gttgggaagg gcgatcgggtg 180
cgggcctctt cgctattacg ccagctggcg aaagggggat gtgctgcaag gcgattaagt 240
tgggtaacgc cagggttttc ccagtcacga cgttgtaaaa cgacggccag tgaattcgag 300
ctcggtagcc ggggatcctc tagagtcgac ctgcaggcat gcaagcttgg cgtaatcatg 360
gtcatagctg tttcctgtgt gaaattgtta tccgctcaca attccacaca acatacgagc 420
cggaagcata aagtgtaaag cctgggggtgc ctaatgagtg agctaactca cattaattgc 480
gttgcgctca ctgcccgctt tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat 540
cggccaacgc gaattcccga cagtaagacg ggtaagcctg ttgatgatac cgctgcctta 600
ctgggtgcat tagccagtct gaatgacctg tcacgggata atccgaagtg gtcagactgg 660
aaaatcagag ggcaggaact gctgaacagc aaaaagtcag atagcaccac atagcagacc 720
cgccataaaa cgccctgaga agcccgtgac ggctttttct tgtattatgg gtagtttctt 780
tgcatgaatc cataaaaggc gcctgtagtg ccatttaccg ccagagccgt 840
gagcgcagcg aactgaatgt cactgaaaag acagcgactc aggtgcctga tggcgggaga 900
caaaaggaat attcagcgat ttgcccagac ttgaggggtg gctacttaag cctttagggt 960
tttaaggtct gttttgtaga ggagcaaaaca gcgtttgcga catccttttg taatactgag 1020
gaactgacta aagtagtgag ttatacacag ggctgggatac tattcttttt atcttttttt 1080
attctttctt tattctataa attataacca attgaaatata aacaaaaaaa acacacaaaag 1140
gtctagcggg atttacagag ggtctagcag aatttacaag ttttccagca aaggctctagc 1200
agaatttaca gataccaca actcaaagga aaaggactag taattatcat tgactagccc 1260
atctcaattg gtatagtgat taaaatcacc tagaccaatt gagatgtatg tctgaattag 1320
ttgttttcaa agcaaatgaa ctagcgatta gtgctatga cttaacggag catgaaacca 1380
agctaatttt atgctgtgtg gcactactca accccacgat tgaaaaccct acaaggaaaag 1440
aacggacggt atcgctcact tataaccaat acgctcagat gatgaacatc agtagggaaa 1500
atgcttatgg tgtattagct aaagcaacca gagagctgat gacgagaact gtggaaatca 1560
ggaatccttt ggttaaaggc tttgagattt tccagtgac aaactatgcc aagttctcaa 1620
gcgaaaaatt agaattagtt ttagtgaaag agatattgcc ttatcttttc cagttaaaaa 1680
aattcataaa atataatctg gaacatgta agtcttttga aaacaaatac tctatgagga 1740
tttatgagtg gttattaaaa gaactaacac aaaagaaaac tcacaaggca aatatagaga 1800
ttagccttga tgaatttaag ttcatgttaa tgcttgaaaa taactacatc gagtttaaaa 1860
ggcttaacca atgggttttg aaaccaataa gtaaagattt aaacacttac agcaatatga 1920
aattgggtgtg tgataagcga ggccgcccga ctgatacgtt gattttccaa gttgactag 1980
atagacaaat ggatctcgta accgaacttg agaacaacca gataaaaatg aatggtgaca 2040
aaataccaac aaccattaca tcagattcct acctacataa cggactaaga aaaacactac 2100
acgatgcttt aactgcaaaa attcagctca ccagttttga ggcaaaattt ttgagtgaca 2160
tgcaaagtta gtatgatctc aatggttcgt tctcatggct cagcaaaaa caacgaacca 2220
cactagagaa catactggct aaatcaggaa ggatctgagg ttcttatggc tcttgatct 2280
atcagtgaag catcaagact aacaacaaa agtagaacia ctgttcaccg ttacatatca 2340
aagggaaaac tgtccatag cacagatgaa aacgggtgtaa aaaagataga tacatcagag 2400
cttttacgag tttttgggtgc attcaagct gttcaccatg aacagatcga caatgtaaca 2460
gatgaacagc atgtaacacc taatagaaca ggtgaaacca gtaaaacaaa gcaactagaa 2520

```

```

catgaaattg aacacctgag acaacttggt acagctcaac agtcacacat agacagcctg 2580
aaacaggcga tgetgcttat cgaatcaaag ctgccgacaa cacgggagcc agtgacgcct 2640
cccgtgggga aaaaatcatg gcaattctgg aagaaatagc gctttcagcc ggcaaaccgg 2700
ctgaagccgg atctgcgatt ctgataacaa actagcaaca ccagaacagc ccgtttgccg 2760
gcagcaaac ccgtgggaat taattcccct gctcgcgcag gctgggtgcc aagctctcgg 2820
gtaacatcaa ggcccgatcc ttggagccct tgcccctccg cacgatgatc gtgccgtgat 2880
cgaaatccag atccttgacc cgagttgca aaccctcact gatccgcatg cccgttccat 2940
acagaagctg ggccaacaaa cgatgctcgc cttccagaaa accgaggatg cgaaccaact 3000
catccggggt cagcaccacc ggcaagcgcc gcgacggccg aggtcttccg atctcctgaa 3060
gccagggcag atccgtgcac agcaccttgc cgtagaagaa cagcaaggcc gccaatgcct 3120
gacgatgcgt ggagaccgaa accttgcgct cgttcgccag ccaggacaga aatgcctcga 3180
cttcgctgct gcccaagggt gccgggtgac gcacaccgtg gaaacggatg aaggcacgaa 3240
cccagtggac ataagcctgt tcggttcgta agctgtaatg caagtacgtt atgctctcac 3300
gcaactggtc cagaaccttg accgaacgca gcggtggtaa cggcgcagtg gcggttttca 3360
tggcttgta tgactgtttt tttgggttac agtctatgcc tcgggcatcc aagcagcaag 3420
cgcgttacgc cgtgggtcga tgtttgatgt tatggagcag caacgatggt acgcagcagg 3480
gcagtcgccc taaaacaaag ttaaaccatca tgagggaaagc ggtgatcgcc gaagtatcga 3540
ctcaactatc agaggtagtt ggcgatcgc agcgccatct cgaaccgacg ttgctggccg 3600
tacatttgta cggctccgca gtggatggcg gcctgaagcc acacagtgat attgatttgc 3660
tggttacggt gaccgtaagg ctgatgaaa caacgcggcg agctttgatc aacgaccttt 3720
tggaaacttc ggcttcccct ggagagagcg agattctccg cgtgtagaa gtcaccattg 3780
ttgtgcacga cgacatcatt ccgtggcggt atccagctaa gcgcgaactg caatttggag 3840
aatggcagcg caatgacatt cttgcaggta tcttcgagcc agccacgatc gacattgatc 3900
tggctatctt gctgacaaaa gcaagagaac atagcgttgc cttggtaggt ccagcggcgg 3960
aggaactctt tgatccggtt cctgaacagg atctatttga ggcgctaaat gaaaccttaa 4020
cgctatggaa ctgcgccgcc gactgggctg gcgatgagcg aaatgtagtg cttacgtttg 4080
cccgcatttg gtacagcgca gtaaccggca aaatcgcgcc gaaggatgtc gctgccgact 4140
gggcaatgga gcgctggccg gccagatc agcccgtcat acttgaagct agacaggctt 4200
atcttgaca agaagaagat cgcttggcct cgcgcgcaga tcagttggaa gaatttgtcc 4260
actacgtgaa agcgcgagat accaaggtag tcggcaata atgtctaaca attcgttcaa 4320
gccgacgccg cttcgcggcg cggcttaact caagcgttag atgcactaag cacataattg 4380
ctcacagcca aactatcagg tcaagtctgc ttttattatt ttaagcgtg cataataagc 4440
cctacacaaa ttgggagata tatcatgaaa ggctggcttt tcttggtat cgcaatagtt 4500
ggcgaagtaa tcgcaacatc cgcattaata tctagcgagg gctttacta 4549

```

<210> 42

<211> 199

<212> DNA

<213> .

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Glucose-Isomerase-Promotor

<220>

<223> Promotor

<400> 42

```

gaattcacta gtcgatctgt gctgtttgc acggtatgca gcaccagcgc gagattatgg 60
gctcgcacgc tcgactgtcg gacgggggca ctggaacgag aagtcaggcg agccgtcacg 120
cccttgacaa tgccacatcc tgagcaata attcaaccac taaacaaatc aaccgcgttt 180
cccggaggtg accaagctt

```

<210> 43

<211> 21

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 43

gacgcaacag tattccgtcg c 21

<210> 44

<211> 42

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 44

atgagctatc gtagttccg ccaggcattc tgagtgttaa cg 42

<210> 45

<211> 33

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 45

gcctggcggga acatacagata gtcataata tac 33

<210> 46

<211> 21

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 46

cggggcgctg ggccagtact g 21

<210> 47

<211> 28

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<220>

<223> Primer

<400> 47

tcaaaccggg tggttctcg cgaccggg 28

<210> 48

<211> 28

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 48

ctcagccgga tatcgacggc gcgctggt 28

<210> 49

<211> 60

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 49

accagcgcgc cgtcgatc cggctgagta ctcaacacct gccagctctt tacgaggt 60

<210> 50

<211> 28

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 50

cagcatgcct gcgaaccaca ggcctatc 28

<210> 51

<211> 28

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 51

atgaacaagt ggggcgtagg gttaacat 28

<210> 52

<211> 28

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<223> Primer

<400> 52

ttaattactt gatttattgt cggttta 28

<210> 53

<211> 1380

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 53

```

ctttaatttt cttttatctt actctcctac ataagacatc aagaacaat tgtatattgt 60
acaccccccc cctccacaaa cacaaatatt gataatataa agatgtctgc tgctgctgat 120
agattaaact taacttccgg ccacttgaat gctggtagaa agagaagttc ctcttctggt 180
tctttgaagg ctgccgaaaa gcctttcaag gttactgtga ttggatctgg taactgggggt 240
actactattg ccaagggtgt tgccgaaaaat tgtaaaggat acccagaagt tttcgctcca 300
atagtacaaa tgtgggtggt cgaagaagag atcaatgggtg aaaaattgac tgaaatcata 360
aatactagac atcaaaacgt gaaatacttg cctggcatca ctctaccoga caatttggtt 420
gctaataccag acttgattga ttcagtcaag gatgtcgaca tcatcgtttt caacattcca 480
catcaatttt tgccccgtat ctgtagccaa ttgaaagggtc atggttgattc acacgtcaga 540
gctatctcct gtctaaaggg ttttgaagtt ggtgctaaag gtgtccaatt gctatcctct 600
tacatcactg aggaactagg tattcaatgt ggtgctctat ctggtgctaa cattgccacc 660
gaagtgcgctc aagaacactg gtctgaaaca acagttgctt accacattcc aaaggatttc 720
agaggcgagg gcaaggacgt cgaccataag gttctaaagg ccttggtcca cagaccttac 780
ttccacgtta gtgtcatcga agatgttgct ggtatctcca tctgtggtgc tttgaagaac 840
gttggtgcct taggttgtgg tttcgtcgaa ggtctaggct ggggtaacaa cgcttctgct 900
gccatccaaa gagtcggttt gggtgagatc atcagattcg gtcaaatggt tttcccagaa 960
tctagagaag aaacatacta ccaagagtct gctggtggtg ctgatttgat caccacctgc 1020
gctggtggta gaaacgtcaa gggtgctagg ctaatggcta cttctggtaa ggacgcctgg 1080
gaatgtgaaa aggagttggt gaatggccaa tccgctcaag gtttaattac ctgcaaagaa 1140
gttcacgaat ggttggaaac atgtggctct gtcgaagact tcccattatt tgaagccgta 1200
taccaaatcg tttacaacaa ctaccaatg aagaacctgc cggacatgat tgaagaatta 1260
gatctacatg aagattagat ttattggaga aagataacat atcatacttc ccccactttt 1320
ttcgaggctc ttctatatca tattcataaa tttagcattat gtcatttctc ataactactt 1380

```

<210> 54

<211> 391

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 54

DE 600 29 971 T2 2007.05.16

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
 1 5 10 15
 Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
 20 25 30
 Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr
 35 40 45
 Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
 50 55 60
 Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
 65 70 75 80
 Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu
 85 90 95
 Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile
 100 105 110
 Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln
 115 120 125

Phe Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His
 130 135 140
 Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly
 145 150 155 160
 Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Gln Cys
 165 170 175
 Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Ile Ala Thr Glu Val Ala Gln Glu His
 180 185 190
 Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Lys Asp Phe Arg Gly
 195 200 205
 Glu Gly Lys Asp Val Asp His Lys Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg
 210 215 220
 Pro Tyr Phe His Val Ser Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile
 225 230 235 240
 Cys Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu
 245 250 255
 Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly
 260 265 270
 Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg
 275 280 285
 Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
 290 295 300
 Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
 305 310 315 320
 Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
 325 330 335
 Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
 340 345 350
 Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
 355 360 365
 Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
 370 375 380
 Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
 385 390

<210> 55

<211> 753

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 55

DE 600 29 971 T2 2007.05.16

atgggattga ctactaaacc tctatctttg aaagttaacg ccgctttggt cgacgtcgac 60
ggtaccatta tcactctca accagccatt gctgcattct ggagggattt cggttaaggac 120
aaaccttatt tcgatgctga acacgttatc caagtctcgc atggttggag aacgtttgat 180
gccattgcta agttcgtcc agactttgcc aatgaagagt atgtaacaa attagaagct 240
gaaattccgg tcaagtacgg tgaaaaatcc attgaagtcc caggtgcagt taagctgtgc 300
aacgctttga acgctctacc aaaagagaaa tgggtgtgg caacttccgg taccctgat 360
atggcacaaa aatggttcga gcatctggga atcaggagac caaagtactt cattaccgct 420

aatgatgtca aacagggtaa gcctcatcca gaaccatatt tgaagggcag gaatggctta 480
ggatatccga tcaatgagca agacccttcc aaatctaagg tagtagtatt tgaagacgct 540
ccagcagga ttgccgccg aaaagccgcc ggttgaaga tcattggtat tgccactact 600
ttcgacttgg acttctaaa ggaaaaaggc tgtgacatca ttgtcaaaaa ccacgaatcc 660
atcagagttg gcggctaaa tgccgaaaca gacgaagttg aattcatttt tgacgactac 720
ttatatgcta aggacgatct gttgaaatgg taa 753

<210> 56

<211> 250

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 56

Met Gly Leu Thr Thr Lys Pro Leu Ser Leu Lys Val Asn Ala Ala Leu
 1 5 10 15
 Phe Asp Val Asp Gly Thr Ile Ile Ile Ser Gln Pro Ala Ile Ala Ala
 20 25 30
 Phe Trp Arg Asp Phe Gly Lys Asp Lys Pro Tyr Phe Asp Ala Glu His
 35 40 45
 Val Ile Gln Val Ser His Gly Trp Arg Thr Phe Asp Ala Ile Ala Lys
 50 55 60
 Phe Ala Pro Asp Phe Ala Asn Glu Glu Tyr Val Asn Lys Leu Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Ile Pro Val Lys Tyr Gly Glu Lys Ser Ile Glu Val Pro Gly Ala
 85 90 95
 Val Lys Leu Cys Asn Ala Leu Asn Ala Leu Pro Lys Glu Lys Trp Ala
 100 105 110
 Val Ala Thr Ser Gly Thr Arg Asp Met Ala Gln Lys Trp Phe Glu His
 115 120 125
 Leu Gly Ile Arg Arg Pro Lys Tyr Phe Ile Thr Ala Asn Asp Val Lys
 130 135 140
 Gln Gly Lys Pro His Pro Glu Pro Tyr Leu Lys Gly Arg Asn Gly Leu
 145 150 155 160
 Gly Tyr Pro Ile Asn Glu Gln Asp Pro Ser Lys Ser Lys Val Val Val
 165 170 175
 Phe Glu Asp Ala Pro Ala Gly Ile Ala Ala Gly Lys Ala Ala Gly Cys
 180 185 190
 Lys Ile Ile Gly Ile Ala Thr Thr Phe Asp Leu Asp Phe Leu Lys Glu
 195 200 205
 Lys Gly Cys Asp Ile Ile Val Lys Asn His Glu Ser Ile Arg Val Gly
 210 215 220
 Gly Tyr Asn Ala Glu Thr Asp Glu Val Glu Phe Ile Phe Asp Asp Tyr
 225 230 235 240
 Leu Tyr Ala Lys Asp Asp Leu Leu Lys Trp
 245 250

<210> 57

<211> 387

<212> PRT

<213> E. coli

<400> 57

Met Asn Asn Phe Asn Leu His Thr Pro Thr Arg Ile Leu Phe Gly Lys
1 5 10 15
Gly Ala Ile Ala Gly Leu Arg Glu Gln Ile Pro His Asp Ala Arg Val
20 25 30
Leu Ile Thr Tyr Gly Gly Gly Ser Val Lys Lys Thr Gly Val Leu Asp
35 40 45
Gln Val Leu Asp Ala Leu Lys Gly Met Asp Val Leu Glu Phe Gly Gly
50 55 60
Ile Glu Pro Asn Pro Ala Tyr Glu Thr Leu Met Asn Ala Val Lys Leu
65 70 75 80
Val Arg Glu Gln Lys Val Thr Phe Leu Leu Ala Val Gly Gly Gly Ser
85 90 95
Val Leu Asp Gly Thr Lys Phe Ile Ala Ala Ala Asn Tyr Pro Glu
100 105 110
Asn Ile Asp Pro Trp His Ile Leu Gln Thr Gly Gly Lys Glu Ile Lys
115 120 125
Ser Ala Ile Pro Met Gly Cys Val Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gly Ser
130 135 140
Glu Ser Asn Ala Gly Ala Val Ile Ser Arg Lys Thr Thr Gly Asp Lys
145 150 155 160
Gln Ala Phe His Ser Ala His Val Gln Pro Val Phe Ala Val Leu Asp
165 170 175
Pro Val Tyr Thr Tyr Thr Leu Pro Pro Arg Gln Val Ala Asn Gly Val
180 185 190
Val Asp Ala Phe Val His Thr Val Glu Gln Tyr Val Thr Lys Pro Val
195 200 205
Asp Ala Lys Ile Gln Asp Arg Phe Ala Glu Gly Ile Leu Leu Thr Leu
210 215 220
Ile Glu Asp Gly Pro Lys Ala Leu Lys Glu Pro Glu Asn Tyr Asp Val
225 230 235 240
Arg Ala Asn Val Met Trp Ala Ala Thr Gln Ala Leu Asn Gly Leu Ile
245 250 255
Gly Ala Gly Val Pro Gln Asp Trp Ala Thr His Met Leu Gly His Glu
260 265 270
Leu Thr Ala Met His Gly Leu Asp His Ala Gln Thr Leu Ala Ile Val
275 280 285
Leu Pro Ala Leu Trp Asn Glu Lys Arg Asp Thr Lys Arg Ala Lys Leu
290 295 300
Leu Gln Tyr Ala Glu Arg Val Trp Asn Ile Thr Glu Gly Ser Asp Asp
305 310 315 320

Glu Arg Ile Asp Ala Ala Ile Ala Ala Thr Arg Asn Phe Phe Glu Gln
 325 330 335
 Leu Gly Val Pro Thr His Leu Ser Asp Tyr Gly Leu Asp Gly Ser Ser
 340 345 350
 Ile Pro Ala Leu Leu Lys Lys Leu Glu Glu His Gly Met Thr Gln Leu
 355 360 365
 Gly Glu Asn His Asp Ile Thr Leu Asp Val Ser Arg Arg Ile Tyr Glu
 370 375 380
 Ala Ala Arg
 385

<210> 58
 <211> 1164
 <212> DNA
 <213> E. coli

<400> 58

```

atgaacaact ttaatctgca cacccaacc cgcattctgt ttggtaaagg cgcaatcgct 60
ggtttacgcg aacaaattcc tcacgatgct cgcgtattga ttacctacgg cggcggcagc 120
gtgaaaaaaaa cggcggttct cgatcaagtt ctggatgccc tgaaaggcat ggacgtgctg 180
gaatttggcg gtattgagcc aaaccggct tatgaaacgc tgatgaacgc cgtgaaactg 240
gttcgcgaac agaaagtgac tttcctgctg gcggttgccg gcggttctgt actggacggc 300
accaaattta tcgccgcagc ggctaactat ccgaaaaata tcgatccgtg gcacattctg 360
caaacggcg gtaaagagat taaaagcgc atcccgatgg gctgtgtgct gacgctgcca 420
gcaaccgggt cagaatccaa cgcaggcgcg gtgatctccc gtaaaaccac aggcgacaag 480
caggcgttcc attctgccc tgttcagccg gtatttgccg tgctcgatcc ggtttatacc 540
tacaccctgc cgccgcgta ggtggtaac ggcgtagtgg acgccttgt acacaccgtg 600
gaacagtatg ttaccaaacc ggttgatgcc aaaattcagg accgtttcgc agaaggcatt 660
ttgctgacgc taatcgaaga tggtcgaaa gccctgaaag agccagaaaa ctacgatgtg 720
cgcgccaacg tcatgtgggc ggcgactcag gcgctgaacg gtttgattgg cgtggcgta 780
cgcgaggact gggcaacgca tatgtgggc cagcaactga ctgcatgca cggctggat 840
cacgcgcaaa cactggctat cgtcctgcct gcactgtgga atgaaaaacg cgataccaag 900
cgcgctaagc tgctgcaata tgctgaacgc gtctggaaca tcaactgaagg ttccgatgat 960
gagcgtattg acgccgcgat tgccgcaacc cgcaatttct ttgagcaatt aggcgtgccg 1020
accacctct ccgactacgg tctggacggc agctccatcc cggettgtet gaaaaaactg 1080
gaagagcacg gcatgaccca actggcgaa aatcatgaca ttacgttggg tgtcagccgc 1140
cgtatatacg aagccgccc gtaaa 1164
    
```

<210> 59
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

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

<400> 59
 gcggtaccgt tgctgacgc tcaggtttc gg 32

<210> 60
 <211> 33
 <212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 60

gcgagctcga cgcttgcct gatcgagttt tgc 33

<210> 61

<211> 33

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 61

gcgagctcga cgcttgcct gatcgagttt tgc 33

<210> 62

<211> 20

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 62

cagctggcaa ttccggttcg 20

<210> 63

<211> 30

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 63

cccagctggc aattccggtt cgcttgctgt 30

<210> 64

<211> 30

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 64

ggcgaccoga cgctccagac ggaagctggt 30

<210> 65

<211> 30

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 65 cogcaagatt cacggaatgca tcttgaaggg 30

<210> 66

<211> 27

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 66

cgccctcttg acgagttctg agcgggga 27

<210> 67

<211> 30

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 67

ggaattcatg aacaacttta atctgcacac 30

<210> 68

<211> 30

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 68

gtttgaggcg taaaaagctt agcgggaggc 30

Patentansprüche

1. Rekombinanter Mikroorganismus, verwendbar für die Herstellung von 1,3-Propandiol, umfassend:
 - (a) mindestens ein Gen, codierend ein Polypeptid mit einer Dehydratase-Aktivität;
 - (b) mindestens ein Gen, codierend einen Dehydratase-Reaktivierungsfaktor; und
 - (c) mindestens ein exogenes Gen, codierend eine nicht-spezifische katalytische Aktivität, 3-Hydroxypropionaldehyd in 1,3-Propandiol umzuwandeln, wobei das mindestens eine exogene Gen eine Nucleinsäure, codierend ein Polypeptid aus mindestens 387 Aminosäuren mit mindestens 80% Homologie mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:57, umfaßt;
 wobei kein funktionelles dhaT-Gen, codierend eine 1,3-Propandiol-Oxidoreductase-Aktivität, in dem rekombinanten Mikroorganismus vorhanden ist, und der Mikroorganismus aus der Gruppe, bestehend aus Citrobacter, Enterobacter, Clostridium, Klebsiella, Aerobacter, Lactobacillus, Aspergillus, Saccharomyces, Schizosaccharomyces, Zygosaccharomyces, Pichia, Kluyveromyces, Candida, Hansenula, Debaryomyces, Mucor, Torulopsis, Methylobacter, Salmonella, Bacillus, Aerobacter, Streptomyces und Pseudomonas, ausgewählt ist.
2. Rekombinanter Mikroorganismus nach Anspruch 1, wobei das mindestens eine exogene Gen ein Polypeptid mit der Sequenz von SEQ ID NO:57 codiert.
3. Rekombinanter Mikroorganismus nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, weiterhin umfassend:
 - (a) mindestens ein Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität; und
 - (b) mindestens ein Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-3-Phosphatase-Aktivität.
4. Rekombinanter Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 3, wobei der Dehydratase-Reaktivierungsfaktor durch orfX und orfZ, isoliert aus einem dha-Regulon, codiert wird.
5. Rekombinanter Mikroorganismus nach Anspruch 4, wobei orfX und orfZ unabhängig aus Klebsiella sp., Citrobacter sp. oder Clostridium sp. isoliert sind.
6. Rekombinanter Mikroorganismus nach Anspruch 3, weiterhin umfassend eine Gruppe von endogenen Genen, jeweils mit einer das Gen inaktivierenden Mutation, wobei die Gruppe aus:

- (a) einem ersten Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-Kinase-Aktivität;
- (b) einem zweiten Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-Dehydrogenase-Aktivität; und
- (c) einem dritten Gen, codierend ein Polypeptid mit Triosephosphat-Isomerase-Aktivität, besteht.

7. Rekombinanter Mikroorganismus nach den Ansprüchen 3 oder 6, wobei der rekombinante Mikroorganismus eine Kohlenstoffquelle, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Monosacchariden, Oligosacchariden, Polysacchariden und ein-Kohlenstoff-Substraten, in 1,3-Propandiol umwandelt.

8. Rekombinanter Mikroorganismus nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei der rekombinante Mikroorganismus eine Kohlenstoffquelle, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Glycerol und Dihydroxyaceton, in 1,3-Propandiol umwandelt.

9. Rekombinanter Mikroorganismus nach den Ansprüchen 3 oder 6, wobei das Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität, aus der Gruppe, bestehend aus GPD1, GPD2, GPD3, DAR1, gpsA, GUT2, glpD und glpABC, ausgewählt ist.

10. Rekombinanter Mikroorganismus nach den Ansprüchen 3 oder 6, wobei das Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-3-Phosphatase-Aktivität, aus der Gruppe, bestehend aus GPP1 und GPP2, ausgewählt ist.

11. Rekombinanter Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1, 2, 3 oder 6, wobei das Gen, codierend ein Polypeptid mit einer Dehydratase-Aktivität, aus der Gruppe, bestehend aus einer Glycerol-Dehydratase und einer Diol-Dehydratase, ausgewählt ist.

12. Rekombinanter Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1, 2, 3 und 6, wobei das Gen, codierend ein Polypeptid mit einer Dehydratase-Aktivität, aus *Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp. oder *Clostridium* sp., isoliert ist.

13. Rekombinante *E. coli*, umfassend:

(a) eine Gruppe von exogenen Genen, bestehend aus:

- (i) mindestens einem Gen, codierend ein Polypeptid mit einer Dehydratase-Aktivität;
- (ii) mindestens einem Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität;
- (iii) mindestens einem Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-3-Phosphatase-Aktivität; und
- (iv) mindestens einem Gen, codierend einen Dehydratase- Reaktivierungsfaktor; und

(b) mindestens ein endogenes Gen, codierend eine nicht-spezifische katalytische Aktivität, 3-Hydroxypropionaldehyd in 1,3-Propandiol umzuwandeln, wobei das mindestens eine endogene Gen eine Nucleinsäure, codierend ein Polypeptid aus mindestens 387 Aminosäuren mit mindestens 80% Homologie mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:57, umfaßt; wobei kein funktionelles dhaT-Gen, codierend eine 1,3-Propandiol-Oxidoreductase-Aktivität, in der rekombinanten *E. coli* vorhanden ist.

14. Rekombinante *E. coli* nach Anspruch 13, wobei das mindestens eine endogene Gen ein Polypeptid mit der Sequenz von SEQ ID NO:57 codiert.

15. Rekombinante *E. coli*, umfassend:

(a) eine Gruppe von exogenen Genen, bestehend aus

- (i) mindestens einem Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität;
- (ii) mindestens einem Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-3-Phosphatase-Aktivität; und
- (iii) mindestens einer Untergruppe von Genen, codierend die Genprodukte von dhaR, orfY, orfX, orfW, dhaB1, dhaB2, dhaB3 und orfZ, und

(b) mindestens ein endogenes Gen, codierend eine nicht-spezifische katalytische Aktivität, 3-Hydroxypropionaldehyd in 1,3-Propandiol umzuwandeln, wobei das mindestens eine endogene Gen eine Nucleinsäure, codierend ein Polypeptid aus mindestens 387 Aminosäuren mit mindestens 80% Homologie mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:57, umfaßt; wobei kein funktionelles dhaT-Gen, codierend eine 1,3-Propandiol-Oxidoreductase-Aktivität, in der rekombinanten *E. coli* vorhanden ist.

16. Rekombinante *E. coli* nach Anspruch 15, wobei das mindestens eine endogene Gen ein Polypeptid mit der Sequenz von SEQ ID NO:57 codiert.

17. Rekombinante E. coli nach Anspruch 16, weiterhin umfassend eine Gruppe von endogenen Genen, wobei jedes Gen eine das Gen inaktivierende Mutation aufweist, wobei die Gruppe aus:

- (a) einem Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-Kinase-Aktivität;
- (b) einem Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-Dehydrogenase-Aktivität; und
- (c) einem Gen, codierend ein Polypeptid mit Triosephosphat-Isomerase-Aktivität, besteht.

18. Verfahren für die Bioproduktion von 1,3-Propandiol, umfassend:

- (a) Inkontaktbringen der rekombinanten E. coli nach entweder Anspruch 16 oder Anspruch 17 unter geeigneten Bedingungen mit mindestens einer Kohlenstoffquelle, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Monosacchariden, Oligosacchariden, Polysacchariden und ein-Kohlenstoff-Substraten, wodurch 1,3-Propandiol erzeugt wird; und
- (b) gegebenenfalls Gewinnen des 1,3-Propandiols, erzeugt in (a).

19. Verfahren für die Bioproduktion von 1,3-Propandiol, umfassend:

- (a) Inkontaktbringen der rekombinanten E. coli nach den Ansprüchen 16 oder 17 oder der rekombinanten E. coli nach den Ansprüchen 16 oder 17, weiterhin umfassend:
 - (i) mindestens ein exogenes Gen, codierend ein Polypeptid mit Dehydratase-Aktivität;
 - (ii) mindestens ein exogenes Gen, codierend einen Dehydratase-Reaktivierungsfaktor;
 - (iii) mindestens ein endogenes Gen, codierend eine nichtspezifische katalytische Aktivität, 3-Hydroxypropionaldehyd in 1,3-Propandiol umzuwandeln, wobei das mindestens eine endogene Gen, codierend eine nichtspezifische katalytische Aktivität, eine Nucleinsäure, codierend ein Polypeptid aus mindestens 387 Aminosäuren mit mindestens 80% Homologie mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:57, umfaßt; mit mindestens einer Kohlenstoffquelle, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Glycerol und Dihydroxyaceton, und
- (b) gegebenenfalls Gewinnen des 1,3-Propandiols, erzeugt in (a).

20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei das mindestens eine endogene Gen, codierend eine nichtspezifische katalytische Aktivität, ein Polypeptid mit der Sequenz von SEQ ID NO:57 codiert.

21. Verfahren für die Herstellung von 1,3-Propandiol, umfassend:

- (a) Inkontaktbringen einer rekombinanten E. coli mit einer ersten Kohlenstoffquelle und mit einer zweiten Kohlenstoffquelle, wobei die rekombinante E. coli umfaßt:
 - (i) mindestens ein exogenes Gen, codierend ein Polypeptid mit einer Dehydratase-Aktivität;
 - (ii) mindestens ein exogenes Gen, codierend einen Dehydratase-Reaktivierungsfaktor;
 - (iii) mindestens ein endogenes Gen, codierend eine nichtspezifische katalytische Aktivität, ausreichend, 3-Hydroxypropionaldehyd in 1,3-Propandiol umzuwandeln, wobei das mindestens eine endogene Gen, codierend eine nichtspezifische katalytische Aktivität, eine Nucleinsäure, codierend ein Polypeptid aus mindestens 387 Aminosäuren mit mindestens 80% Homologie mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:57, umfaßt; wobei kein funktionelles dhaT-Gen, codierend eine 1,3-Propandiol-Oxidoreductase-Aktivität, in der rekombinanten E. coli vorhanden ist und wobei die erste Kohlenstoffquelle aus der Gruppe, bestehend aus Glycerol und Dihydroxyaceton, ausgewählt ist und die zweite Kohlenstoffquelle aus der Gruppe, bestehend aus Monosacchariden, Oligosacchariden, Polysacchariden und ein-Kohlenstoff-Substraten, ausgewählt ist; und
- (b) gegebenenfalls Gewinnen des 1,3-Propandiols, erzeugt in (a).

22. Verfahren nach Anspruch 21, wobei das mindestens eine endogene Gen, codierend eine nichtspezifische katalytische Aktivität, ein Polypeptid mit der Sequenz von SEQ ID NO:57 codiert.

23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei die rekombinante E. coli weiterhin umfasst:

- (a) eine Gruppe von exogenen Genen, bestehend aus
 - (i) mindestens einem Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität;
 - (ii) mindestens einem Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-3-Phosphatase-Aktivität; und
 - (iii) mindestens einer Untergruppe von Genen, codierend die Genprodukte von dhaR, orfY, orfX, orfW, dhaB1, dhaB2, dhaB3 und orfZ, und
- (b) eine Gruppe von endogenen Genen, wobei jedes Gen eine das Gen inaktivierende Mutation aufweist, wobei die Gruppe aus:
 - (i) einem Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-Kinase-Aktivität;
 - (ii) einem Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-Dehydrogenase-Aktivität; und
 - (iii) einem Gen, codierend ein Polypeptid mit Triosephosphat-Isomerase-Aktivität, besteht.

24. Vektor pKP32, umfassend dhaR, orfY, orfX, orfW, dhaB1, dhaB2, dhaB3 und orfZ, wie angegeben in SEQ ID NO: 1.

25. Rekombinanter E. coli-Stamm, umfassend:

- (a) eine Gruppe von zwei endogenen Genen, wobei jedes Gen eine das Gen inaktivierende Mutation aufweist, wobei die Gruppe aus
 - (i) einem Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-Kinase-Aktivität; und
 - (ii) einem Gen, codierend ein Polypeptid mit einer Glycerol-Dehydrogenase-Aktivität;besteht;
- (b) mindestens ein exogenes Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität;
- (c) mindestens ein exogenes Gen, codierend ein Polypeptid mit Glycerol-3-Phosphatase-Aktivität; und
- (d) einen Vektor pKP32, wie definiert in Anspruch 24, wobei kein funktionelles dhaT-Gen, codierend eine 1,3-Propandiol-Oxidoreductase-Aktivität, in der rekombinanten E. coli vorhanden ist.

26. Verfahren für die Herstellung von 1,3-Propandiol, umfassend:

- (a) Inkontaktbringen einer rekombinanten E. coli, die ein dha-Regulon umfaßt und der ein funktionelles dhaT-Gen, codierend eine 1,3-Propandiol-Oxidoreductase-Aktivität, fehlt, unter geeigneten Bedingungen mit mindestens einer Kohlenstoffquelle, wobei die Kohlenstoffquelle aus der Gruppe, bestehend aus Monosacchariden, Oligosacchariden, Polysacchariden und ein-Kohlenstoff-Substraten, ausgewählt ist, und
- (b) gegebenenfalls Gewinnen des 1,3-Propandiols, erzeugt in (a).

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

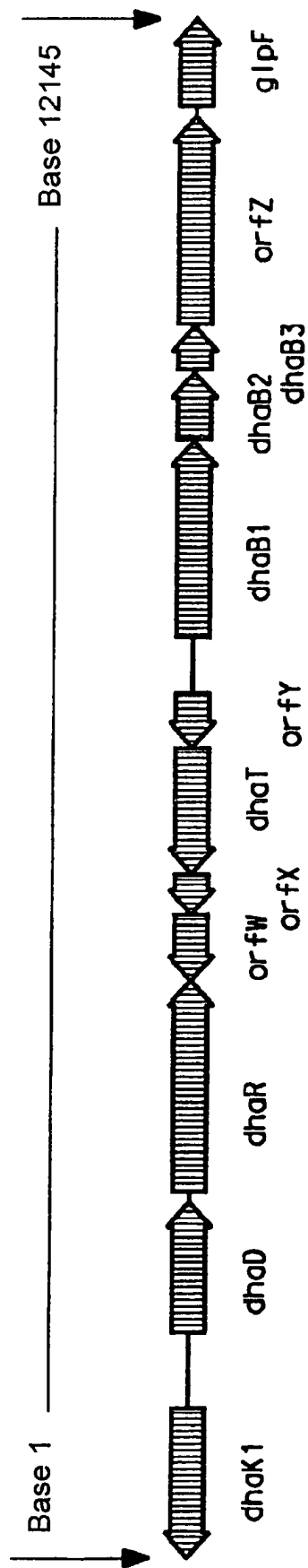


FIG. 1

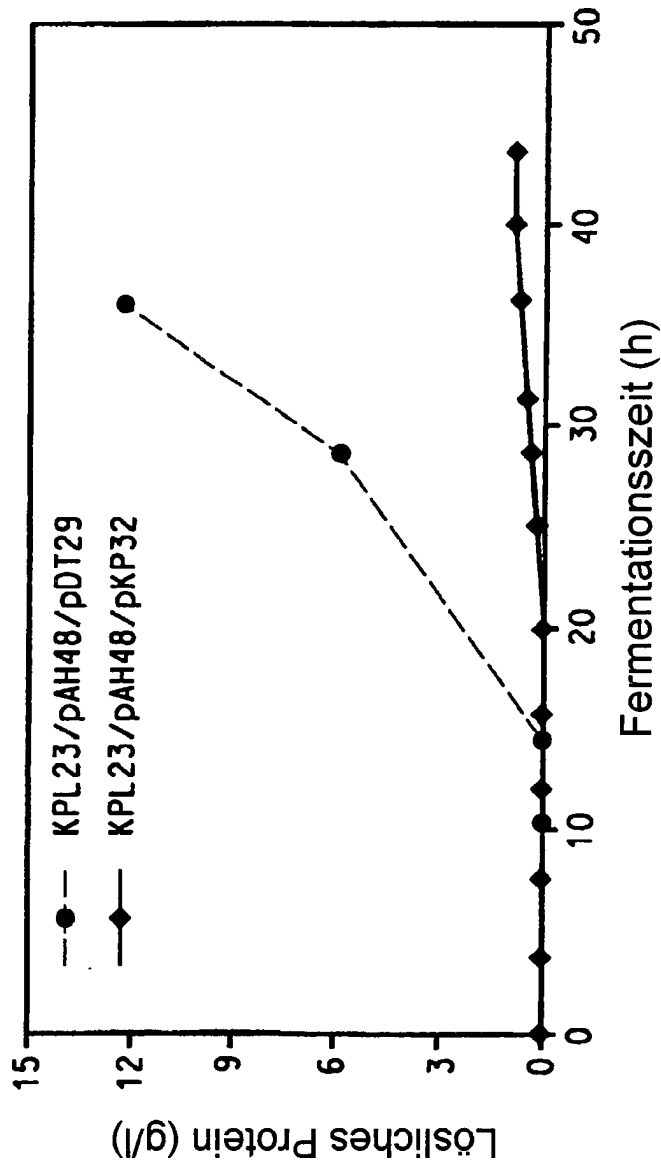


FIG. 2

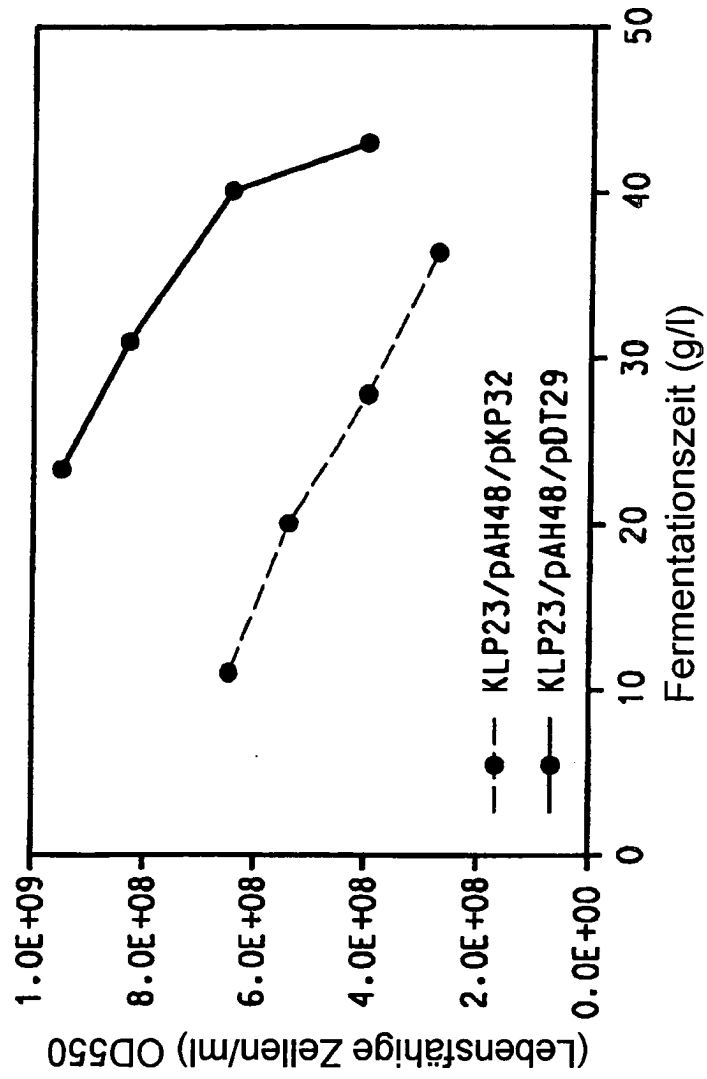


FIG. 3

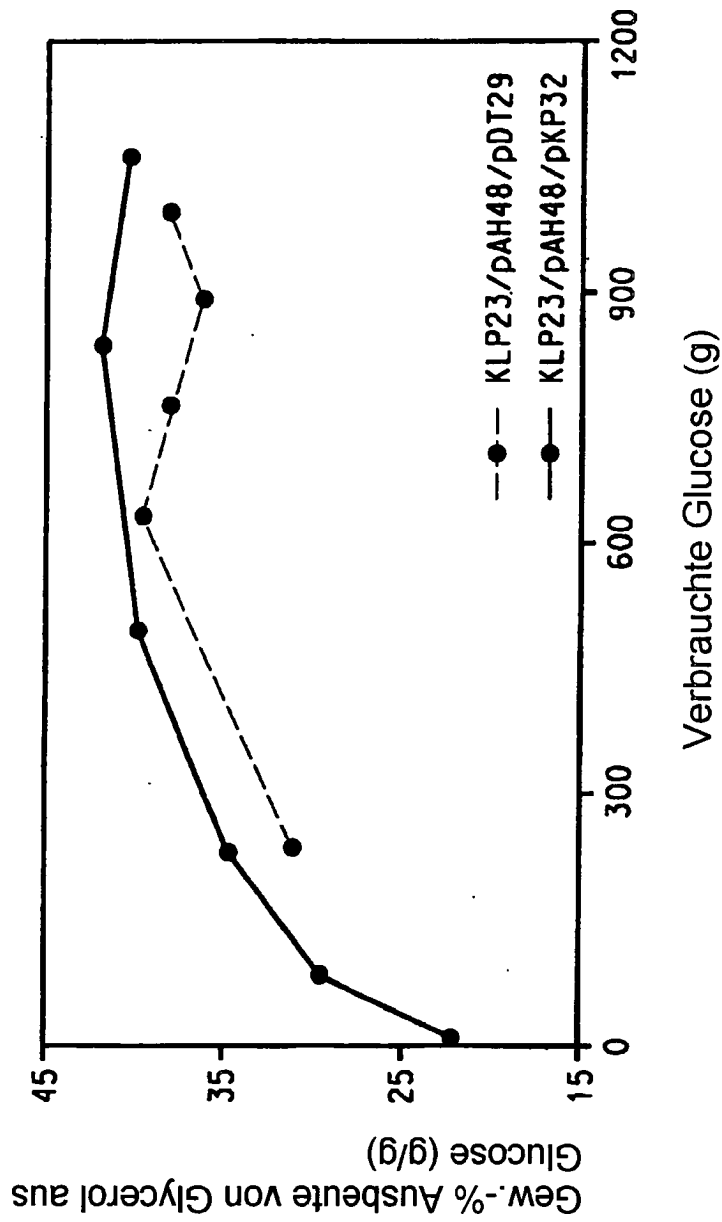


FIG. 4

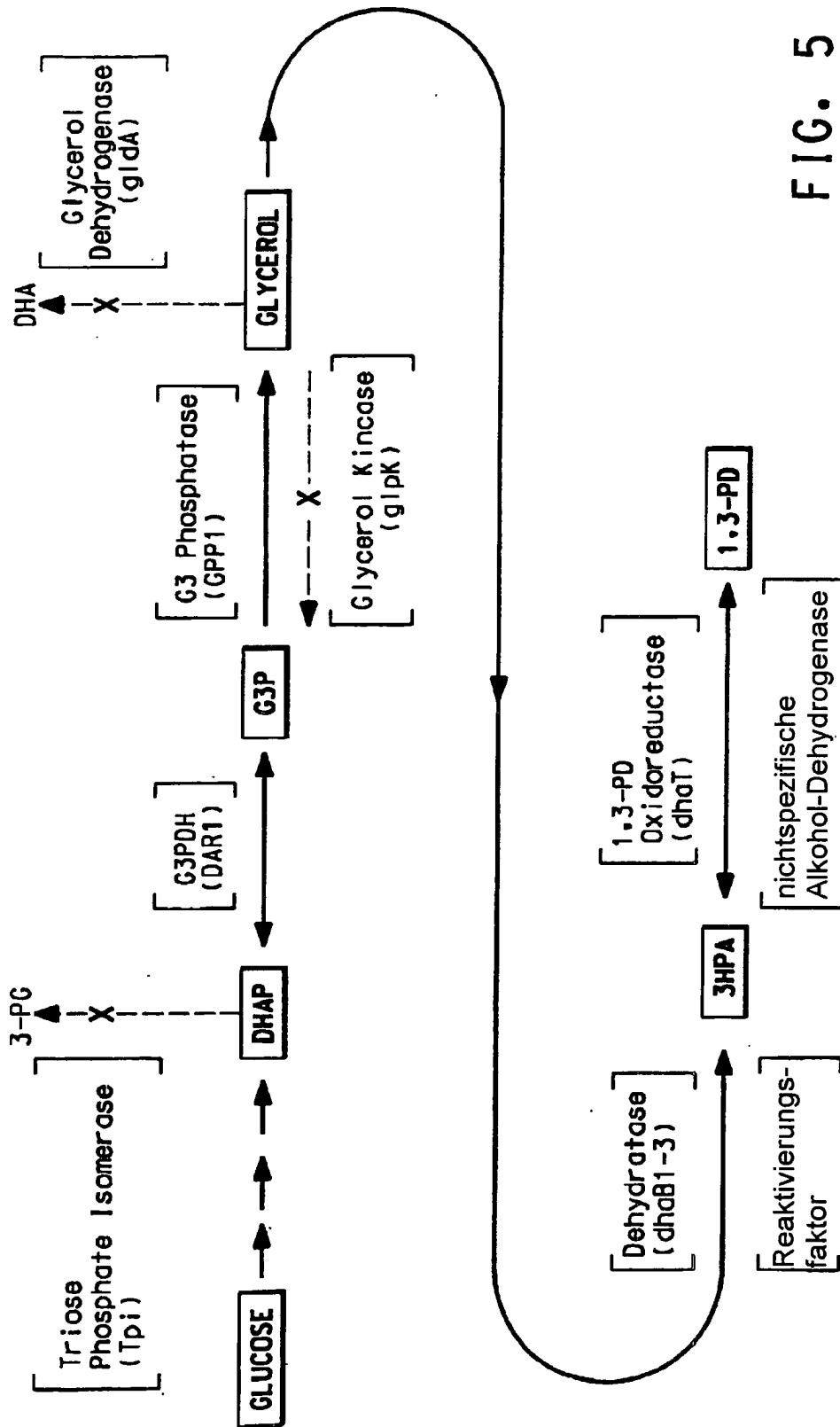


FIG. 5

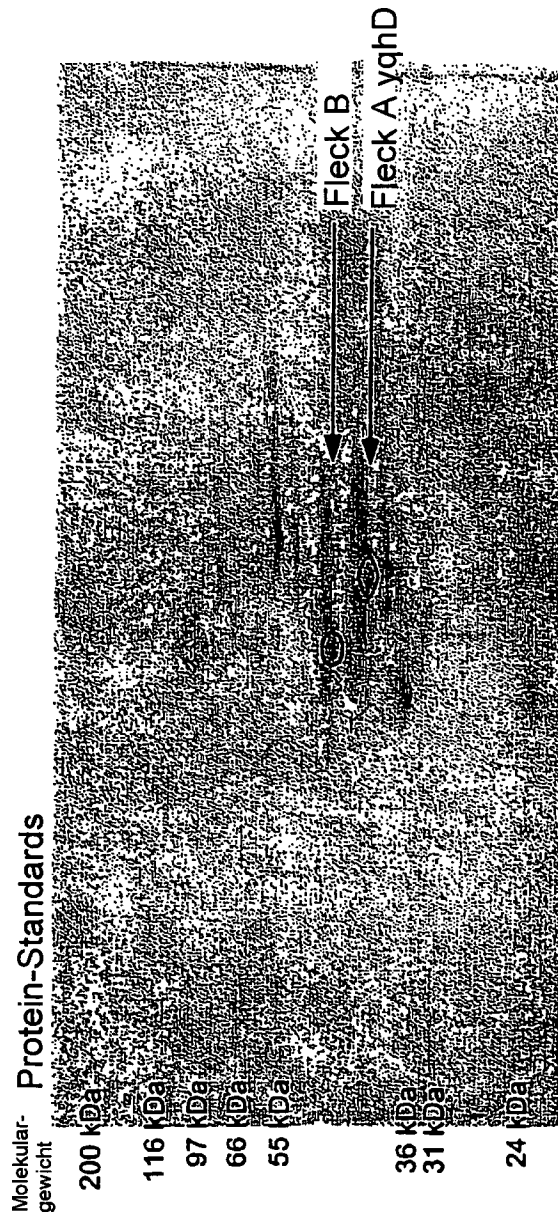


FIG. 6