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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
17. Januar 2008 (17.01.2008)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2008/006680 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
C07K 14/43 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2007/056153

(22) Internationales Anmeldedatum:
20. Juni 2007 (20.06.2007)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2006 032 634.2 13. Juli 2006 (13.07.2006) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **EVONIK DEGUSSA GMBH** [DE/DE]; Bennigsenplatz 1, 40474 Düsseldorf (DE).

(71) Anmelder *(nur für US)*: **BATHE, Brigitte** [DE/DE]; Twieten 1, 33154 Salzkotten (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **CLAES, Wilfried** [DE/DE]; Goldbach 8, 33615 Bielefeld (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: **EVONIK DEGUSSA GMBH**; DG-IPM-PAT, Postcode 84/339, Rodenbacher Chaussee 4, 63457 Hanau (DE).

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

(84) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:
— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*
— *mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektronischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich*

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING L-AMINO ACIDS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON L-AMINOSÄUREN

(57) Abstract: The invention relates to novel polynucleotides, coding for a polypeptide with citrate synthase activity, bacteria comprising the same, preferably of the species Corynebacterium and Escherichia, and methods for producing amino acids using said bacteria. The invention particularly relates to an isolated polynucleotide, coding for a polypeptide with the amino acid sequence SEQ ID NO:2, wherein the L-aspartic acid in position 5 of the amino acid sequence is replaced by another proteinogenic amino acid and the polypeptide has citrate synthase activity.

(57) Zusammenfassung: Gegenstand der Erfindung sind neue, für ein Polypeptid mit Citratsynthase Aktivität kodierende Polynukleotide, Bakterien die diese enthalten, bevorzugt der Gattung Corynebacterium und Escherichia, und Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren unter Verwendung dieser Bakterien. Gegenstand der Erfindung ist dabei insbesondere ein isoliertes Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, welches die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2 umfasst, wobei die L-Asparaginsäure an Position 5 der Aminosäuresequenz durch eine andere proteinogene Aminosäure ersetzt ist und wobei das Polypeptid Citratsynthase Aktivität besitzt.

WO 2008/006680 A2

Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren

Gegenstand der Erfindung sind neue, für ein Polypeptid mit Citratsynthase Aktivität kodierende Polynukleotide, Bakterien, die diese enthalten, und Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren unter Verwendung dieser Bakterien.

Stand der Technik

Aminosäuren finden in der Humanmedizin, in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, dass Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien, wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und die Aminosäuren produzieren. Ein bekannter Antimetabolit ist das Lysinanalogon S-(2-Aminoethyl)-L-Cystein (AEC).

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure produzierenden Stämmen der Gattung Corynebacterium, insbesondere Corynebacterium glutamicum,

eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

Zusammenfassende Darstellungen zur Biologie, Genetik und Biotechnologie von Corynebacterium glutamicum sind im „Handbook of Corynebacterium glutamicum" (Eds.: L. Eggeling und M. Bott, CRC Press, Taylor & Francis, 2005), in der Spezialausgabe des Journal of Biotechnolgy (Chief Editor: A. Pühler) mit dem Titel „A New Era in Corynebacterium glutamicum Biotechnology" (Journal of Biotechnolgy 104/1-3, (2003)) und im Buch von T. Scheper (Managing Editor) „Microbial Production of L-Amino Acids" (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 79, Springer Verlag, Berlin, Deutschland, 2003) zu finden.

Die Nukleotidsequenz des Genoms von Corynebacterium glutamicum ist bei Ikeda und Nakagawa (Applied Microbiology and Biotechnology 62, 99-109 (2003)), in der EP 1 108 790 und bei Kalinowski et al. (Journal of Biotechnolgy 104/1-3, (2003)) beschrieben.

Die Nukleotidsequenz des Genoms von Corynebacterium efficiens ist bei Nishio et al (Genome Research. 13 (7), 1572-1579 (2003)) beschrieben.

Die Nukleotidsequenzen des Genoms von Corynebacterium glutamicum und Corynebacterium efficiens sind ebenfalls in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) der National Library of Medicine (Bethesda, MD, USA), in der DNA Data Bank of Japan (DDBJ, Mishima, Japan) oder in der Nukleotidsequenz-Datenbank der European Molecular Biologies Laboratories (EMBL, Heidelberg, Deutschland bzw. Cambridge, UK) verfügbar.

Die aus dem Stand der Technik bekannte Wildtypsequenz der Kodierregion des gltA-Gens von Corynebacterium glutamicum ist in der SEQ ID NO: 1 im Beschreibungsteil der vorliegenden Anmeldung dargestellt. In der SEQ ID NO: 3 und 25 sind darüberhinaus die stromaufwärts und stromabwärts

der Kodierregion gelegenen Sequenzen dargestellt. Die Aminosäuresequenz des kodierten GltA-Polypeptids (Citratsynthase) ist dementsprechend in den SEQ ID NO's: 2, 4 und 26 wiedergegeben.

Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt neue Maßnahmen zur verbesserten Herstellung von L-Aminosäuren, bevorzugt L-Lysin, L-Valin und L-Isoleucin, besonders bevorzugt L-Lysin bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, welches die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2 umfasst, wobei die L-Asparaginsäure an Position 5 der Aminosäuresequenz durch eine andere proteinogene Aminosäure, bevorzugt L-Valin, L-Leucin und L-Isoleucin, besonders bevorzugt L-Valin, ersetzt ist und wobei das Polypeptid Citratsynthase Aktivität (EC Nr. 4.1.3.7) besitzt. Gegebenenfalls enthält das Polypeptid einen oder mehrere konservative Aminosäureaustausch(e), wobei durch die konservativen Aminosäureaustausche die Citratsynthase-Aktivität des Polypeptids im wesentlichen unverändert bleibt.

Unter proteinogenen Aminosäuren versteht man die Aminosäuren, die in natürlichen Proteinen, das heißt in Proteinen von Mikroorganismen, Pflanzen, Tieren und Menschen vorkommen. Hierzu gehören insbesondere L-Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparaginsäure, L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutaminsäure, L-Glutamin, Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan, L-Prolin und L-Arginin.

Die Begriffe Polypeptid und Protein werden als Synonyme verwendet.

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Vektoren und Bakterien, bevorzugt der Gattung Corynebacterium und Escherichia, besonders bevorzugt der Spezies Corynebacterium glutamicum und Escherichia coli, die das genannte Polynukleotid enthalten oder unter Verwendung des genannten Polynukleotids hergestellt wurden.

Gegenstand der Erfindung sind schließlich Bakterien bevorzugt der Gattung Corynebacterium und Escherichia, besonders bevorzugt der Spezies Corynebacterium glutamicum und Escherichia coli, die mit dem genannten Vektor transformiert worden sind.

Der Begriff Transformation umfasst sämtliche Methoden zur Übertragung von Polynukleotiden, insbesondere DNA, in ein gewünschtes Bakterium. Hierzu gehören unter anderem die Verwendung von isolierter DNA bei der Transformation, Elektrotransformation bzw. Elektroporation, die Übertragung durch Zellkontakt wie bei der Konjugation oder die Übertragung von DNA mittels Partikelbeschuss.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Bakterium, insbesondere rekombinantes Bakterium, der Gattung Corynebacterium, welches ein Polynukleotid enthält, das für ein Polypeptid mit Citratsynthase-Aktivität kodiert, welches die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2 umfasst, wobei an Position 5 der Aminosäuresequenz jede proteinogene Aminosäure ausgenommen L-Asparaginsäure, bevorzugt L-Valin, L-Leucin und L-Isoleucin, besonders bevorzugt L-Valin, enthalten ist. Gegebenenfalls enthält das Polypeptid einen oder mehrere konservative Aminosäureaustausch(e), wobei durch die konservativen Aminosäureaustausche die Citratsynthase-Aktivität des Polypeptids im wesentlichen unverändert bleibt.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, bevorzugt L-Lysin, L-Valin und L-Isoleucin, besonders bevorzugt L-Lysin, dadurch gekennzeichnet, dass es folgende Schritte umfasst:

a) Fermentation der erfindungsgemäßen rekombinanten Bakterien der Gattung Corynebacterium in einem geeignetem Nährmedium, und

b) Akkumulation der L-Aminosäure in dem Nährmedium oder in den Zellen der Bakterien.

Mit L-Aminosäuren sind die proteinogenen Aminosäuren gemeint.

Wird im Folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt, sind damit nicht nur die Basen, sondern sind auch die Salze wie z.B. L-Lysin-Monohydrochlorid oder L-Lysin-Sulfat gemeint.

Bei den Bakterien der Gattung Corynebacterium werden L-Aminosäure-ausscheidende Stämme bevorzugt, die auf folgenden Arten beruhen:

Corynebacterium efficiens, wie zum Beispiel der Stamm DSM44549,

Corynebacterium glutamicum, wie zum Beispiel der Stamm ATCC13032,

Corynebacterium thermoaminogenes wie zum Beispiel der Stamm FERM BP-1539, und

Corynebacterium ammoniagenes, wie zum Beispiel der Stamm ATCC6871,

wobei die Art Corynebacterium glutamicum ganz besonders bevorzugt wird.

Einige Vertreter der Art Corynebacterium glutamicum sind im Stand der Technik auch unter anderen Bezeichnungen bekannt. Hierzu gehören beispielsweise:

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870,
Corynebacterium lilium DSM20137,
Corynebacterium melassecola ATCC17965,
Brevibacterium flavum ATCC14067,

Brevibacterium lactofermentum ATCC13869, und
Brevibacterium divaricatum ATCC14020.

Bekannte Vertreter Aminosäure-ausscheidender Stämme der Gattung Corynebacterium sind beispielsweise die L-Lysin produzierenden Stämme:

Corynebacterium glutamicum DM58-1/pDM6 (= DSM4697) beschrieben in EP 0 358 940,
Corynebacterium glutamicum MH20-22B (= DSM16835) beschrieben in Menkel et al. (Applied and Environmental Microbiology 55(3), 684-688 (1989)),
Corynebacterium glutamicum AHP-3 (= Ferm BP-7382) beschrieben in EP 1 108 790,
Corynebacterium glutamicum DSM16834 beschrieben in (PCT/EP2005/012417),
Corynebacterium glutamicum DSM17119 beschrieben in (PCT/EP2006/060851),
Corynebacterium glutamicum DSM17223 beschrieben in (PCT/EP2006/062010),
Corynebacterium glutamicum DSM16937 beschrieben in (PCT/EP2005/057216), und
Corynebacterium thermoaminogenes AJ12521 (= FERM BP-3304) beschrieben in US 5,250,423;

oder die L-Valin produzierenden Stämme:

Brevibacterium lactofermentum FERM BP-1763 beschrieben in US 5,188,948,
Brevibacterium lactofermentum FERM BP-3007 beschrieben in US 5,521,074,
Corynebacterium glutamicum FERM BP-3006 beschrieben in US 5,521,074, und
Corynebacterium glutamicum FERM BP-1764 beschrieben in US 5,188,948;

oder die L-Isoleucin produzierenden Stämme:

Brevibacterium flavum FERM-BP 759 beschrieben in US 4,656,135,

Corynebacterium glutamicum FERM-BP 757.
beschrieben in US 4,656,135,
Brevibacterium flavum FERM-BP 760.
beschrieben in US 4,656,135,
Corynebacterium glutamicum FERM-BP 758
beschrieben in US 4,656,135,
Brevibacterium flavum FERM BP-2215
beschrieben in US 5,705, 370, und
Brevibacterium flavum FERM BP-2433
beschrieben in US 5,705, 370.

Angaben zur taxonomischen Einordnung von Stämmen dieser Gruppe von Bakterien findet man unter anderem bei Seiler (Journal of General Microbiology 129, 1433-1477 (1983)), Kämpfer und Kroppenstedt (Canadian Journal of Microbiology 42, 989-1005 (1996)), Liebl et al (International Journal of Systematic Bacteriology 41, 255-260 (1991)) und in der US 5,250,434.

Stämme mit der Bezeichnung „ATCC" können von der American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) bezogen werden. Stämme mit der Bezeichnung „DSM" können von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) bezogen werden. Stämme mit der Bezeichnung „FERM" können vom National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba Ibaraki, Japan) bezogen werden. Der Stamm Corynebacterium thermoaminogenes (FERM BP-1539, ist in der US 5,250,434 beschrieben.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Polynukleotide können klassische in-vivo Mutageneseverfahren mit Zellpopulationen von Bakterien der Gattung Corynebacterium unter Verwendung mutagener Stoffe wie beispielsweise N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG) oder von ultraviolettem Licht verwendet werden. Mutagenesemethoden sind beispielsweise im Manual of Methods for General Bacteriology (Gerhard et al. (Eds.), American Society for Microbiology, Washington, DC, USA, 1981) oder bei Tosaka et al. (Agricultural and

Biological Chemistry 42(4), 745-752 (1978)) oder bei Konicek et al (Folia Microbiologica 33, 337-343 (1988)) beschrieben.

Aus der mutagenisierten Zellpopulation werden diejenigen Mutanten entnommen und vermehrt, welche L-Glutaminsäure oder Zitronensäure benötigen, um auf einem Minimalagar wachsen zu können oder deren Wachstum auf Minimalagar durch Gabe von L-Glutaminsäure bzw. Zitronensäure verbessert wird. Es ist weiterhin möglich ausgehend von den L-Glutaminsäure- bzw. Zitronensäure-bedürftigen Mutanten sogenannte Revertanten zu isolieren, die für ihr Wachstum die L-Glutaminsäure bzw. Zitronensäure nicht benötigen. Diese L-Glutaminsäure- bzw. Zitronensäure-auxotrophen Mutanten beziehungsweise deren Revertanten werden anschließend untersucht. Technische Einzelheiten zur Isolierung von Mutanten mit defekter Citratsynthase Aktivität können beispielsweise bei Shiio et al. (Agricultural and Biological Chemistry 46(1), 101-107 (1982)) nachgelesen werden.

Anschließend wird aus den Mutanten DNA bereitgestellt, beziehungsweise isoliert und mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primerpaaren, die die Amplifizierung des gltA-Gens bzw. gltA-Allels erlauben, das entsprechende Polynukleotid synthetisiert und isoliert.

Hierzu können beliebige Primerpaare aus der stromaufwärts und stromabwärts der Kodierregion gelegenen Nukleotidsequenz und der dazu komplementären Nukleotidsequenz ausgewählt werden (Siehe SEQ ID NO's: 3 und 25). Ein Primer eines Primerpaares umfasst hierbei bevorzugt mindestens 15, mindestens 18, mindestens 20, mindestens 21 oder mindestens 24 aufeinanderfolgende Nukleotide ausgewählt aus der Nukleotidsequenz zwischen Position 1 und 1000 von SEQ ID NO:25. Der dazugehörige zweite Primer eines Primerpaares umfasst mindestens 15, mindestens 18, mindestens 20, mindestens 21 oder mindestens 24 aufeinanderfolgende Nukleotide ausgewählt aus der

komplementären Nukleotidsequenz zwischen Position 3314 und 2312 von SEQ ID NO:25.

Anleitungen und Informationen zur PCR findet der Fachmann beispielsweise im Handbuch „PCR-Strategies" (Innis, Felfand und Sninsky, Academic Press, Inc., 1995), im Handbuch von Diefenbach und Dveksler „PCR Primer - a laboratory manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press,1995), im Handbuch von Gait „Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach" (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham „PCR" (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Weitere Anleitungen zur PCR finden sich beispielsweise in der WO 06/100177 auf Seiten 15 bis 17.

In einem weiteren Arbeitschritt wird dann die Nukleotidsequenz des Polynukleotids bestimmt. Diese kann beispielsweise nach dem Kettenabbruchverfahren von Sanger et al. (Proceedings of the National Academies of Sciences, U.S.A., 74, 5463-5467 (1977)) mit den von Zimmermann et al. (Nucleic Acids Research 18, 1067pp (1990)) angegebenen Modifikationen bestimmt werden.

Das von dieser Nukleotidsequenz kodierte Polypeptid kann dann bezüglich der Aminosäuresequenz analysiert werden. Dazu wird die Nukleotidsequenz in ein Programm zur Übersetzung von DNA-Sequenz in eine Aminosäuresequenz eingegeben. Geeignete Programme sind beispielsweise das Programm „Patentin", das bei Patentämtern, beispielsweise dem US-Patentamt (USPTO) erhältlich ist, oder das „Translate Tool", das auf dem ExPASy Proteomics Server im World Wide Web (Gasteiger et al., Nucleic Acids Research 31, 3784-3788 (2003)) verfügbar ist.

Es ist ebenfalls möglich das erfindungsgemäße Polynukleotid, das im Folgenden auch als erfindungsgemäßes gltA-Allel bezeichnet wird, durch Methoden der in vitro Genetik herzustellen.

Geeignete Methoden für die in-vitro Mutagenese sind unter anderem die Behandlung mit Hydroxylamin nach Miller (Miller, J. H.: A Short Course in Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1992) oder der Einsatz einer Polymerasekettenreaktion unter Verwendung einer DNA-Polymerase, die eine hohe Fehlerquote aufweist. Eine derartige DNA-Polymerase ist beispielsweise die Mutazyme DNA Polymerase (GeneMorph PCR Mutagenesis Kit, Nr.600550) der Firma Stratagene (LaJolla, CA, USA). Weiterhin können mutagene Oligonukleotide, wie bei T. A. Brown (Gentechnologie für Einsteiger, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1993) und R. M. Horton (PCR-Mediated Recombination and Mutagenesis, Molecular Biotechnology 3, 93-99 (1995)) beschrieben, eingesetzt werden. Die von Papworth et al. (Strategies 9(3), 3-4 (1996)) beschriebene Methode unter Verwendung des "Quik Change Site-directed Mutagenesis Kit" der Firma Stratagene (La Jolla, California, USA) kann ebenfalls eingesetzt werden.

Methoden zur Bestimmung der Citratsynthase Aktivität können bei Eikmanns et al. (Microbiology 140, 1817-1828 (1994)) und bei Shiio et al. (Agricultural and Biological Chemistry 46(1), 101-107 (1982)) nachgelesen werden.

Es ist weiterhin möglich, das erfindungsgemäße Allel der Citratsynthase in Corynebacterium glutamicum oder Escherichia coli zu überexprimieren, um es beispielsweise anschließend in aufgereinigter beziehungsweise isolierter Form darzustellen.

Auf diese Weise wurde ein Polynukleotid isoliert, das die in SEQ ID NO:5 dargestellte Nukleotidsequenz aufweist. Das von diesem Polynukleotid kodierte Polypeptid ist in SEQ ID NO:6 und 8 dargestellt. Es enthält an Position 5 der Aminosäuresequenz L-Valin anstelle L-Asparaginsäure.

Es wurde gefunden, dass der Stamm ATCC13032, wenn er anstelle des Wildtyp gltA-Gens mit dem erfindungsgemäßen

gltA-Allel ausgestattet ist, welches für die Citratsynthase gemäß SEQ ID NO:6 kodiert (ATCC13032::gltA D5V), im Vergleich zum Wildtyp Stamm ATCC13032, welcher die Citratsynthase gemäß SEQ ID NO:2 enthält, eine um ca. 40% bis maximal ca. 90% verringerte Enzymaktivität, bevorzugt eine um ca. 70% bis maximal ca. 90% verringerte Enzymaktivität aufweist.

Es ist bekannt, dass konservative Aminosäureaustausche die Enzymaktivität nur unwesentlich verändern. Gegenstand der Erfindung sind dementsprechend auch Polynukleotide, die für Polypeptide mit Citratsynthase Aktivität kodieren, welche zusätzlich zu den erfindungsgemäßen Aminosäureaustauschen an Position 5 der Aminosäuresequenz einen (1) oder mehrere konservative(n) Aminosäureaustausch(e) enthalten, welche(r) die enzymatische Aktivität im wesentlichen nicht ändert. Das heisst sie bleibt im wesentlichen unverändert. Der Begriff „im wesentlichen nicht geändert" bzw. „im wesentlichen unverändert" bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die Citratsynthase Aktivität des Polypeptids um maximal 20 %, bevorzugt maximal 10% und besonders bevorzugt um maximal 5% bis maximal 2% verändert ist im Vergleich zur Citratsynthase Aktivität des Polypeptids gemäß SEQ ID NO:10 oder SEQ ID NO:6, bevorzugt SEQ ID NO:6.

Für einen experimentellen Test wird das gltA-Gen des Stammes ATCC 13032 gegen das gltA-Allel, welches für ein Polypeptid, enthaltend den erfindungsgemäßen Aminosäureaustausch an Position 5 und einen oder mehrere konservative Aminosäureaustausch(e), kodiert, ausgetauscht. Anschließend wird der Stamm kultiviert, ein Zellextrakt hergestellt und die Citratsynthase-Aktivität bestimmt. Als Referenz wird die Citratsynthase-Aktivit in Stamm ATCC13032::gltA D5V bestimmt.

Anstelle von Stamm ATCC13032 können auch L-Lysin ausscheidende Stämme von Corynebacterium glutamicum eingesetzt werden, welche die Kodierregion des gltA-Gens des Wildtyps einschließlich der stromaufwärts gelegenen

Nukleotidsequenzen, entsprechend der Nukleotidsequenz zwischen Position 1 und 2064 von SEQ ID NO:3, bevorzugt SEQ ID NO:3, enthalten. Geeignete Stämme sind beispielsweise DSM16833 beschrieben in PCT/EP2005/012417, DSM13994 beschrieben in EP 1 239 040 A2 oder DSM17576 beschrieben in DE 102005045301. In diese Stämme lässt sich durch Allelaustausch die entsprechende(n) Mutation(en) in die Kodierregion des gltA-Gens einführen.

Es ist ebenfalls möglich die Polypeptide zu reinigen und an den gereinigten Polypeptiden die Vergleichstests durchzuführen.

Das Enzym Citratsynthase (EC Nr. 4.1.3.7) katalysiert die Kondensationsreaktion von Oxalacetat und Acetyl-CoA, wobei als Reaktionsprodukte Zitronensäure und Coenzym A (CoA) entstehen. In der Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, Kanehisa Laboratory, Bioinformatics Center, Institute for Chemical Research, Kyoto University, Japan) wird dem Enzym die Nr. EC 2.3.3.1 zugeordnet.

Bei den aromatischen L-Aminosäuren spricht man von konservativen Austauschen, wenn L-Phenylalanin, L-Tryptophan und L-Tyrosin gegeneinander ausgetauscht werden. Bei den hydrophoben L-Aminosäuren spricht man von konservativen Austauschen, wenn L-Leucin, L-Isoleucin und L-Valin gegeneinander ausgetauscht werden. Bei den polaren L-Aminosäuren spricht man von konservativen Austauschen, wenn L-Glutamin und L-Asparagin gegeneinander ausgetauscht werden. Bei den basischen L-Aminosäuren spricht man von konservativen Austauschen, wenn L-Arginin, L-Lysin und L-Histidin gegeneinander ausgetauscht werden. Bei den sauren L-Aminosäuren spricht man von konservativen Austauschen, wenn L-Asparaginsäure und L-Glutaminsäure gegeneinander ausgetauscht werden. Bei den Hydroxyl-Gruppen enthaltenden L-Aminosäuren spricht man von konservativen Austauschen, wenn L-Serin und L-Threonin gegeneinander ausgetauscht werden.

Bevorzugt enthält das Polypeptid höchstens zwei (2), höchstens drei (3), höchstens vier (4) oder höchstens fünf (5) konservative Aminosäureaustausche zusätzlich zu dem erfindungsgemäßen Austausch an Position 5 von SEQ ID NO:2.

Es ist bekannt, dass durch wirtseigene Enzyme, sogenannte Aminopeptidasen, das endständige Methionin bei der Proteinsynthese entfernt wird.

Die isolierten Polynukleotide, die für die erfindungsgemäße Citratsynthase Variante kodieren, oder Teile davon, können dazu verwendet werden, um rekombinante Stämme der Gattung Corynebacterium, bevorzugt Corynebacterium glutamicum herzustellen, die den erfindungsgemäßen Aminosäureaustausch an Position 5 der Aminosäuresequenz des Citratsynthase-Polypeptids enthalten und die im Vergleich zum Ausgangs- beziehungsweise Elternstamm in verbesserter Weise L-Aminosäuren in das sie umgebende Medium abgeben oder im Zellinneren anhäufen.

Bevorzugt werden solche Ausgangsstämme verwendet, die bereits die Fähigkeit besitzen mindestens 1 g/l, bevorzugt mindestens 5 g/l, besonders bevorzugt mindestens 10 g/l der gewünschten L-Aminosäure in das sie umgebende Nährmedium auszuscheiden.

Eine verbreitete Methode zum Einbau von Mutationen in Gene von Bakterien der Gattung Corynebacterium, insbesondere der Art Corynebacterium glutamicum, ist die des Allelaustausches, die auch unter der Bezeichnung „gene replacement" bekannt ist. Bei diesem Verfahren wird ein DNA-Fragment, welches die interessierende Mutation enthält, in den gewünschten Stamm überführt und die Mutation durch wenigstens zwei Rekombinationsereignisse beziehungsweise „cross over"-Ereignisse in das Chromosom des gewünschten Stammes inkorporiert beziehungsweise die im betreffenden Stamm vorhandene Sequenz eines Gens gegen die mutierte Sequenz ausgetauscht.

Das DNA-Fragment, enthaltend die interessierende Mutation, liegt bei dieser Methode typischerweise in einem Vektor, insbesondere einem Plasmid, vor, das vorzugsweise von dem mit der Mutation zu versehenden Stamm nicht oder nur begrenzt, d. h. unter ausgewählten Kulturbedingungen, repliziert wird. Als Hilfs- oder Zwischenwirt, in dem der Vektor replizierbar ist, wird im Allgemeinen ein Bakterium der Gattung Escherichia, bevorzugt der Spezies Escherichia coli verwendet.

Beispiele für derartige Plasmidvektoren sind die von Schäfer et al. (Gene 145, 69-73 (1994)) beschriebenen pK*mob und pK*mobsacB Vektoren, wie beispielsweise pK18mobsacB, und die in der WO 02/070685 und WO 03/014362 beschriebenen Vektoren. Diese sind in Escherichia coli aber nicht in Corynebacterium replikativ. Besonders geeignet sind Vektoren, die ein konditional negativ dominant wirkendes Gen wie beispielsweise das sacB-Gen (Levansucrase-Gen) von beispielsweise Bacillus oder das galK-Gen (Galaktosekinase-Gen) von beispielsweise Escherichia coli enthalten. Unter einem konditional negativ dominant wirkenden Gen versteht man ein Gen, das unter bestimmten Bedingungen nachteilig beispielsweise toxisch für den Wirt ist, unter anderen Bedingungen aber keine negativen Auswirkungen auf den das Gen tragenden Wirt hat. Diese ermöglichen die Selektion auf Rekombinationsereignisse, bei denen der Vektor aus dem Chromosom eliminiert wird.

Weiterhin wurde von Nakamura et al. (US 6,303,383) ein Temperatur-sensitives Plasmid für Corynebacterium beschrieben, das lediglich bei Temperaturen unterhalb von 31°C replizieren kann. Es kann ebenfalls für die Massnahmen der Erfindung eingesetzt werden.

Der Vektor wird anschließend durch Konjugation beispielsweise nach der Methode von Schäfer (Journal of Bacteriology 172, 1663-1666 (1990)) oder Transformation beispielsweise nach der Methode von Dunican und Shivnan

(Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) oder der Methode von Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)) in das Corynebacterium überführt. Gegebenenfalls kann die Überführung der DNA auch durch ballistische Methoden (z. B. Partikelbeschuss) erzielt werden.

Nach homologer Rekombination mittels eines ersten, Integration bewirkenden "cross-over"-Ereignisses und eines geeigneten zweiten, eine Exzision bewirkenden "cross-over"-Ereignisses im Zielgen bzw. in der Zielsequenz erreicht man den Einbau der Mutation und erhält ein rekombinantes Bakterium. Als Zielgen bezeichnet man das Gen, in dem der gewünschte Austausch erfolgen soll.

Zur Identifizierung und Charakterisierung der erhaltenen Stämme können unter anderem die Methoden der Southern Blotting Hybridisierung, der Polymerase-Kettenreaktion, der Sequenzbestimmung, die Methode des „Fluorescence Resonance Energy Transfer" (FRET) (Lay et al. Clinical Chemistry 43, 2262-2267 (1997)) oder Methoden der Enzymologie eingesetzt werden.

Von Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991) wurde diese Methode verwendet um ein lysA-Allel, welches eine Deletion trug, und um ein lysA-Allel, welches eine Insertion trug in das Chromosom von C. glutamicum anstelle des Wildtypgens einzubauen.

Von Nakagawa et al. (EP 1108790) und Ohnishi et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 58(2), 217-223 (2002)) wurde diese Methode eingesetzt um verschiedene Mutationen ausgehend von den isolierten Allelen bzw. Polynukleotiden in das Chromosom von C. glutamicum einzubauen. Auf diese Weise gelang es Nakagawa et al. eine als Val59Ala bezeichnete Mutation in das Homoserin-Dehydrogenase Gen (hom), eine als Thr311Ile bezeichnete Mutation in das Aspartatkinase-Gen (lysC bzw. ask), eine als Pro458Ser bezeichnete Mutation in das Pyruvat-Carboxylase-Gen (pyc) und eine als Ala213Thr bezeichnete

Mutation in das Glucose-6-phoshat-Dehydrogenase Gen (zwf) von C. glutamicum Stämmen einzubauen.

Für den Einbau der erfindungsgemäßen Mutation im gltA-Gen in das Chromosom mittels Allelaustausch kann ein Polynukleotid verwendet werden, das für eine Aminosäuresequenz kodiert, die den erfindungsgemäßen Aminosäureaustausch an Position 5 von SEQ ID NO:2, wie in SEQ ID NO:10 dargestellt, aufweist und stromaufwärts und stromabwärts davon eine Nukleotidsequenz mit einer Länge von jeweils mindestens ca. 51 (siehe auch SEQ ID NO:11 und 12) bevorzugt jeweils mindestens ca. 101 bzw. 102, (siehe auch SEQ ID NO:13 und 14) besonders bevorzugt jeweils mindestens ca. 201 Nukleobasen (siehe auch SEQ ID NO:15 und 16) und ganz besonders bevorzugt jeweils mindestens ca. 500 bzw. 498 Nukleobasen (siehe auch SEQ ID NO:17 und 18) ausgewählt aus SEQ ID NO:9 besitzt. Die maximale Länge der stromaufwärts und stromabwärts der Mutation gelegenen Nukleotidsequenz liegt im Allgemeinen bei ca. 500, ca. 750, ca. 1000, ca. 1500, ca. 2000 bis 2100 Nukleobasen. Die stromaufwärts der Mutation gelegene Nukleotidsequenz umfasst beispielsweise die Sequenz zwischen Position 1 bis 762 von SEQ ID NO:9 oder die Sequenz zwischen Position 1 bis 1012 von SEQ ID NO:25. Die stromabwärts der Mutation gelegene Nukleotidsequenz umfasst beispielsweise die Sequenz zwischen Position 766 bis 2814 von SEQ ID NO:9 oder die Sequenz zwischen Position 1016 bis 3314 von SEQ ID NO:25. Die Gesamtlänge des für den Allelaustausch eingesetzten Polynukleotids beträgt dementsprechend maximal ca. 1000, maximal ca. 1500, maximal ca. 2000, maximal ca. 3000 oder maximal ca. 4000 bis 4200 Nukleobasen.

Gegenstand der Erfindung ist dementsprechend ein Polynukleotid, das eine Nukleotidsequenz umfasst, welche von Position 1 bis 39 die Nukleotidsequenz entsprechend Position 1 bis 39 von SEQ ID NO:11 und von Position 40 bis 105 eine Nukleotidsequenz enthält, die für die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:12 kodiert, wobei an

Position 5 jede proteinogene Aminosäure ausgenommen L-Asparaginsäure enthalten ist.

In diesem Zusammenhang entsprechen die Positionsangaben 1 bis 39 von SEQ ID NO:11 den Positionsangaben 712 bis 750 von SEQ ID NO:9. Die Positionsangaben 40 bis 105 von SEQ ID NO:11 entsprechen den Positionsangaben 751 bis 816 von SEQ ID NO:9.

In einer bevorzugten Form umfasst das Polynukleotid die Nukleotidsequenz von SEQ ID NO:11, wobei das Kodon entsprechend Position 52 bis 54 für jede proteinogene Aminosäure ausgenommen L-Asparaginsäure kodiert.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst das Polynukleotid die Nukleotidsequenz von Position 712 bis 816 von SEQ ID NO:7.

Gegenstand der Erfindung ist dementsprechend weiterhin ein Polynukleotid das eine Nukleotidsequenz umfasst, welche von Position 1 bis 89 die Nukleotidsequenz entsprechend Position 1 bis 89 von SEQ ID NO:13 und von Position 90 bis 206 eine Nukleotidsequenz enthält, die für die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:14 kodiert, wobei an Position 5 jede proteinogene Aminosäure ausgenommen L-Asparaginsäure enthalten ist.

In diesem Zusammenhang entsprechen die Positionsangaben 1 bis 89 von SEQ ID NO:13 den Positionsangaben 662 bis 750 von SEQ ID NO:9. Die Positionsangaben 90 bis 206 von SEQ ID NO:13 entsprechen den Positionsangaben 751 bis 867 von SEQ ID NO:9.

In einer bevorzugten Form umfasst das Polynukleotid die Nukleotidsequenz von SEQ ID NO:13, wobei das Kodon entsprechend Position 102 bis 104 für jede proteinogene Aminosäure ausgenommen L-Asparaginsäure kodiert.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst das Polynukleotid die Nukleotidsequenz von Position 662 bis 867 von SEQ ID NO:7.

Gegenstand der Erfindung ist dementsprechend schließlich ein Polynukleotid das eine Nukleotidsequenz umfasst, welche von Position 1 bis 189 die Nukleotidsequenz entsprechend Position 1 bis 189 von SEQ ID NO:15 und von Position 190 bis 405 eine Nukleotidsequenz enthält, die für die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:16 kodiert, wobei an Position 5 jede proteinogene Aminosäure ausgenommen L-Asparaginsäure enthalten ist.

In diesem Zusammenhang entsprechen die Positionsangaben 1 bis 189 von SEQ ID NO:15 den Positionsangaben 562 bis 750 von SEQ ID NO:9. Die Positionsangaben 190 bis 405 von SEQ ID NO:15 entsprechen den Positionsangaben 751 bis 966 von SEQ ID NO:9.

In einer bevorzugten Form umfasst das Polynukleotid die Nukleotidsequenz von SEQ ID NO:15, wobei das Kodon entsprechend Position 202 bis 204 für jede proteinogene Aminosäure ausgenommen L-Asparaginsäure kodiert.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst das Polynukleotid die Nukleotidsequenz von Position 562 bis 966 von SEQ ID NO:7.

Gegenstand der Erfindung ist dementsprechend schließlich auch ein Polynukleotid das eine Nukleotidsequenz umfasst, welche von Position 1 bis 488 die Nukleotidsequenz entsprechend Position 1 bis 488 von SEQ ID NO:17 und von Position 489 bis 1001 eine Nukleotidsequenz enthält, die für die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:18 kodiert, wobei an Position 5 jede proteinogene Aminosäure ausgenommen L-Asparaginsäure enthalten ist.

In diesem Zusammenhang entsprechen die Positionsangaben 1 bis 488 von SEQ ID NO:17 den Positionsangaben 263 bis 750 von SEQ ID NO:9. Die Positionsangaben 489 bis 1001 von SEQ ID NO:15 entsprechen den Positionsangaben 751 bis 1263 von SEQ ID NO:9.

In einer bevorzugten Form umfasst das Polynukleotid die Nukleotidsequenz von SEQ ID NO:17, wobei das Kodon entsprechend Position 501 bis 503 für jede proteinogene Aminosäure ausgenommen L-Asparaginsäure kodiert.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst das Polynukleotid die Nukleotidsequenz von Position 263 bis 1263 von SEQ ID NO:7.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst das Polynukleotid die Nukleotidsequenz von Position 9 bis 1687 von SEQ ID NO:31.

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls Vektoren, bevorzugt Plasmide, die die genannten Polynukleotide enthalten.

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls Bakterien bevorzugt der Gattung Escherichia, besonders bevorzugt der Art Escherichia coli, und Corynebacterium, besonders bevorzugt der Art Corynebacterium glutamicum, die die genannten Vektoren enthalten.

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls Stämme der Gattung Corynebacterium, bevorzugt der Spezies Corynebacterium glutamicum, die unter Verwendung der erfindungsgemäßen Polynukleotide oder unter Verwendung von Vektoren, die die erfindungsgemäßen Polynukleotide enthalten, hergestellt wurden.

Es ist ebenfalls möglich das erfindungsgemäße gltA-Allel an einen anderen Ort im Chromosom von Corynebacterium glutamicum einzubauen. Hierbei kann es sich beispielsweise um die Orte bzw. Gene aecD, ccpA1, ccpA2, citA, citB, citE, fda, gluA, gluB, gluC, gluD, luxR, luxS, lysR1, lysR2, lysR3, menE, mqo, pck, pgi und poxB handeln, so wie in der WO 03/04037 beschrieben. Hierbei kann es sich weiterhin beispielsweise um intergenische Regionen, DNA von Prophagen, defekten Phagen und Phagen Komponenten handeln, so wie in der WO 04/069996 beschrieben.

Die erfindungsgemäß erhaltenen, rekombinanten Stämme zeigen eine im Vergleich zum eingesetzten Ausgangsstamm beziehungsweise Elternstamm erhöhte Ausscheidung beziehungsweise Produktion der gewünschten Aminosäure in einem Fermentationsprozess.

Die für die Massnahmen der Erfindung einsetzbaren L-Lysin ausscheidenden Ausgangstämme besitzen neben anderen Eigenschaften insbesondere eine Lysin-insensitive Aspartatkinase.

Unter einer Lysin-insensitive Aspartatkinase versteht man ein Polypeptid bzw. Protein mit Aspartatkinase-Aktivität (EC Nr 2.7.2.4), die im Vergleich zur Wildform eine geringere Empfindlichkeit gegenüber der Hemmung durch Mischungen von Lysin und Threonin oder Mischungen von AEC (Aminoethylcystein) und Threonin oder Lysin allein oder AEC allein aufweisen. Derartige Aspartatkinasen werden auch als „feed back" resistente beziehungsweise desensibilisierte Aspartatkinasen bezeichnet. Die für diese desensibilisierten Aspartatkinasen bzw. Aspartatkinasevarianten kodierenden Nukleotidsequenzen werden auch als $lysC^{FBR}$-Allele bezeichnet. Informationen zu zahlreichen $lysC^{FBR}$-Allelen sind in den öffentlichen Datenbanken verfügbar. Einige Autoren bezeichnen das lysC-Gen auch als ask-Gen.

Die Kodierregion des Wildtyp lysC-Gens von Corynebacterium glutamicum entsprechend der Zugangsnummer AX756575 der NCBI Datenbank ist in SEQ ID NO:19 und das von diesem Gen kodierte Polypeptid in SEQ ID NO:20 dargestellt. In der SEQ ID NO:21 sind außerdem die stromaufwärts des 5'-Endes und stromabwärts des 3'-Endes der Kodierregion gelegenen Nukleotidsequenzen angegeben. SEQ ID NO:20 entspricht SEQ ID NO:22.

Die für die Massnahmen der Erfindung eingesetzten L-Lysin ausscheidenden Bakterien verfügen bevorzugt über ein lysC-Allel, das für eine Aspartatkinasevariante kodiert, welche die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:20 besitzt, wobei diese

eine oder mehrere der Aminosäureaustausche ausgewählt aus der Gruppe:

a) LysC A279T (Austausch von L-Alanin an Position 279 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 20 gegen L-Threonin; siehe US 5,688,671 und Zugangsnummern E06825, E06826, E08178 und I74588 bis I74597),

b) LysC A279V (Austausch von L-Alanin an Position 279 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 20 gegen L-Valin, siehe JP 6-261766 und Zugangsnummer E08179),

c) LysC L297Q (Austausch von L-Leucin an Position 297 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 20 gegen eine andere proteinogene Aminosäure, bevorzugt L-Glutamin; siehe DE 102006026328),

d) LysC S301F (Austausch von L-Serin an Position 301 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 20 gegen L-Phenylalanin; siehe US 6,844,176 und Zugangsnummer E08180),

e) LysC S301Y (Austausch von L-Serin an Position 301 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 20 gegen L-Tyrosin, siehe Kalinowski et al. (Molecular and General Genetics 224, 317-324 (1990)) und Zugangsnummer X57226),

f) LysC T308I (Austausch von L-Threonin an Position 308 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 20 gegen L-Isoleucin; siehe JP 6-261766 und Zugangsnummer E08181)

g) LysC T311I (Austausch von L-Threonin an Position 311 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 20 gegen L-Isoleucin; siehe WO 00/63388 und US 6,893,848),

h) LysC S317A (Austausch von L-Serin an Position 317 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 20 gegen L-Alanin; siehe US 5,688,671 und Zugangsnummer I74589),

i) LysC R320G (Austausch von L-Arginin an Position 320 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 20 gegen Glycin; siehe Jetten et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 43, 76-82 (995)) und Zugangsnummer L27125),

j) LysC G345D (Austausch von Glycin an Position 345 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 20 gegen L-Asparaginsäure; siehe Jetten et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 43, 76-82 (995)) und Zugangsnummer L16848),

k) LysC T380I (Austausch von L-Threonin an Position 380 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 20 gegen L-Isoleucin; siehe WO 01/49854 und Zugangsnummer AX192358), und

l) LysC S381F (Austausch von L-Serin an Position 381 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 20 gegen L-Phenylalanin; siehe EP 0435132)

umfasst.

Ganz besonders bevorzugt werden Stämme, deren Aspartatkinasevarianten den Aminosäureaustausch LysC T311I oder einen oder mehrere der Aminosäureaustausche ausgewählt aus der Gruppe LysC A279T, LysC L297Q, LysC S317A, LysC T380I und LysC S381F enthalten.

Es ist naturgemäß ebenfalls möglich zunächst den Einbau der erfindungsgemäßen Mutation im gltA-Gen des Chromosoms eines Bakteriums der Gattung Corynebacterium durchzuführen und anschließend eine oder mehrere der gewünschte(n) Mutation(n) im lysC-Gen des betreffenden Stammes einzubauen.

In einer weiteren Ausführungsform liegen die beschriebenen Aspartatkinasen in dem Corynebacterium, welches den erfindungsgemäßen Aminosäureaustausch im gltA-Gen enthält, überexprimiert vor.

Unter Überexpression versteht man allgemein eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration oder Aktivität einer Ribonukleinsäure, eines Proteins oder eines Enzyms im Vergleich zum Ausgangsstamm (Elternstamm) oder Wildtypstamm. Unter einem Ausgangsstamm (Elternstamm) versteht man den Stamm, an dem die zur Überexpression führende Massnahme durchgeführt wurde.

Die Erhöhung der Konzentration oder Aktivität lässt sich beispielsweise dadurch erzielen, dass man die Kopienzahl der entsprechenden Polynukleotide chromosomal oder extrachromosomal um mindestens eine Kopie erhöht.

Eine weit verbreitete Methode zur Erhöhung der Kopienzahl besteht darin, dass man das entsprechende Polynukleotid in einen Vektor, bevorzugt ein Plasmid, einbaut, der von einem coryneformen Bakterium repliziert wird. Geeignete Plasmidvektoren sind beispielsweise pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554) oder die von Tauch et al. (Journal of Biotechnology 99, 79-91 (2002)) beschriebenen pSELF-Vektoren. Ein Übersichtsartikel zum Thema Plasmide in Corynebacterium glutamicum findet sich bei Tauch et al. (Journal of Biotechnology 104, 27-40 (2003)).

Weiterhin kann man als Vektoren Transposons, Insertionselemente (IS-Elemente) oder Phagen einsetzen. Derartige genetische Systeme sind beispielsweise in den Patentschriften US 4,822,738, US 5,804,414 und US 5,804414. In gleicher Weise kann das in der WO 92/02627 beschriebene IS-Element ISaB1 oder das Transposon Tn 45 des Plasmids pXZ10142 (zitiert im „Handbook of Corynebacterium glutamicum" (Herausgeber: L. Eggeling und M. Bott)) verwendet werden.

Eine andere verbreitete Methode zur Erzielung einer Überexpression ist das Verfahren der chromosomalen Genamplifikation. Bei dieser Methode wird mindestens eine zusätzliche Kopie des interessierenden Polynukleotids in das Chromosom eines coryneformen Bakteriums eingefügt.

Derartige Amplifikationsverfahren sind beispielsweise in der WO 03/014330 oder WO 03/040373 beschrieben.

Eine weitere Methode zur Erzielung einer Überexpression besteht darin, das entsprechende Gen beziehungsweise Allel in funktioneller Weise (operably linked) mit einem Promotor beziehungsweise einer Expressionskassette zu verknüpfen. Geeignete Promotoren für Corynebacterium glutamicum sind beispielsweise in der Fig. 1 des Übersichtsartikel von Patek et al. (Journal of Biotechnology 104(1-3), 311-323 (2003)) beschrieben. In gleicher Weise können die von Vasicova et al (Journal of Bacteriology 181, 6188-6191 (1999)) beschrieben Varianten des dapA-Promotors, beispielsweise der Promotor A25 eingesetzt werden. Weiterhin kann der gap-Promotor von Corynebacterium glutamicum (EP 06007373) verwendet werden. Schließlich können die hinlänglich bekannten von Amann et al. (Gene 69(2), 301-315 (1988)) und Amann und Brosius (Gene 40(2-3), 183-190 (1985)) beschriebenen Promotoren T3, T7, SP6, M13, lac, tac und trc verwendet werden. Ein derartiger Promotor kann beispielsweise stromaufwärts des betreffenden Gens, typischerweise im Abstand von ungefähr 1 - 500 Nukleobasen vom Startkodon eingefügt werden.

Durch die Maßnahmen der Überexpression, wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Polypeptids im allgemeinen um mindestens 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% oder 500%, maximal bis 1000% oder 2000% bezogen auf die Aktivität oder Konzentration des Polypeptids im Stamm vor der zur Überexpression führenden Massnahme, erhöht.

In einer weiteren Ausführungsform besitzen die erfindungsgemäßen Bakterien der Gattung Corynebacterium, die bevorzugt außerdem ein Polynukleotid enthalten, das für eine Lysin-insensitive Aspartatkinasevariante kodiert, eines oder mehrere der Merkmale ausgewählt aus der Gruppe

a) überexprimiertes Polynukleotid (dapA-Gen), das für eine Dihydrodipicolinat-Synthase (DapA, EC Nr. 4.2.1.52)kodiert,

b) überexprimiertes Polynukleotid (asd-Gen), das für eine Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase (Asd, EC Nr. 1.2.1.11) kodiert,

c) überexprimiertes Polynukleotid, (lysA-Gen), das für eine Diaminopimelat-Decarboxylase (LysA, EC Nr. 4.1.1.20) kodiert,

d) überexprimiertes Polynukleotid (aat-Gen), das für eine Aspartat-Aminotransferase (Aat, EC Nr. 2.6.1.1) kodiert,

e) überexprimiertes Polynukleotid (lysE-Gen), das für eine Polypeptid mit L-Lysin-Export Aktivität (LysE, Lysin Efflux Permease) kodiert,

f) ausgeschaltete oder abgeschwächte Aktivität der Malat-Dehydrogenase (Mdh, EC Nr. 1.1.1.37),

g) ausgeschaltete oder abgeschwächte Aktivität der Malat-Chinon Oxidoreduktase (Mqo, EC Nr. 1.1.99.16),

h) überexprimiertes Polynukleotid, das für eine Pyruvat-Carboxylase (Pyc, EC Nr. 6.4.1.1) kodiert, und

i) ausgeschaltete oder abgeschwächte Aktivität der E1p Untereinheit des Pyruvat-Dehydrogenase Komplexes (AceE, EC Nr. 1.2.4.1).

Die Merkmale a) bis g) werden besonders bevorzugt.

Zur Überexpression der aufgeführten Gene beziehungsweise Polynukleotide können die im Stand der Technik bekannten Gene, beispielsweise die sogenannten Wildtypgene, von Escherichia coli (Blattner et al., Science 277(5), 1453-1462 (1997)), Bacillus subtilis (Kunst et al, Nature 390 (6657), 249-256 (1997)), Bacillus licheniformis (Veith et al, Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 7

(4), 204-211 (2004)), Mycobacterium tuberculosis (Fleischmann et al, Journal of Bacteriology 1841, 5479-5490 (2004)), Mycobacterium bovis (Garnier et al, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 100 (13), 7877-7882 (2003)), Streptomyces coeliclor (Redenbach et al, Molecular Microbiology 21 (1), 77-96 (1996)), Lactobacillus acidophilus (Altermann et al, Proceedings of the National Acadamy of Sciences U.S.A. 102 (11), 3906-3912 (2005)), Lactobacillus johnsonii (Pridmore et al, Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A. 101 (8), 2512-2517 (2004)), Bifidobacterium longum (Schell et al, Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A. 99 (22), 14422-14427 (2002)), und Saccharomyces cerevisiae verwendet werden. Die Genome der Wildtypformen dieser Bakterien liegen in sequenzierter und annotierter Form vor. Vorzugsweise werden die endogenen Gene beziehungsweise Polynukleotide der Gattung Corynebacterium, besonders bevorzugt der Art Corynebacterium glutamicum verwendet.

Unter endogenen Genen beziehungsweise Polynukleotiden versteht man die in der Population einer Art vorhandenen offenen Leserahmen (ORF), Gene oder Allele beziehungsweise deren Polynukleotide.

Das dapA-Gen von Corynebacterium glutamicum Stamm ATCC13032 ist beispielsweise in der EP 0 197 335 beschrieben. Zur Überexpression des dapA-Gens von Corynebacterium glutamicum können außerdem unter anderem die Mutationen MC20 und MA16 des dapA-Promotors, wie in der US 6,861,246 beschrieben, eingesetzt werden.

Das asd-Gen von Corynebacterium glutamicum Stamm ATCC 21529 ist beispielsweise in der US 6,927,046 beschrieben.

Das lysA-Gen von Corynebacterium glutamicum ATCC13869 (Brevibacterium lactofermentum) ist beispielsweise in der US 6,090,597 beschrieben.

Das aat-Gen von Corynebacterium glutamicum ATCC13032 ist beispielsweise bei Kalinowski et al (Journal of

Biotechnology 104 (1-3), 5-25 (2003); siehe auch Zugangsnummer NC_006958) beschrieben. Es wird dort als aspB-Gen bezeichnet. In der US 6,004,773 wird ein für eine Aspartat-Aminotransferase kodierendes Gen als aspC bezeichnet. Marienhagen et al (Journal of Bacteriology 187 (22), 7639-7646 (2005) bezeichnen das aat-Gen als aspT-Gen.

Das lysE-Gen von Corynebacterium glutamicum R127 ist beispielweise in der US 6,858,406 beschrieben. Bei Stamm R127 handelt es sich um eine restriktionsdefekte Mutante von ATCC13032 (Liebl et al, FEMS Microbiology Letters 65, 299-304 (1989)). In gleicher Weise kann das in der US 6,861,246 verwendete lysE-Gen von Stamm ATCC13032 eingesetzt werden.

Das pyc-Gen von Corynebacterium glutamicum von Stamm ATCC 13032 ist beispielsweise in der WO 99/18228 und WO 00/39305 beschrieben. Weiterhin können Allele des pyc-Gens verwendet werden wie sie beispielsweise in der US 6,965,021 beschrieben sind. Die in dieser Patentschrift beschriebenen Pyruvat-Carboxylasen besitzen einen oder mehrere der Aminosäureaustausche ausgewählt aus der Gruppe: Pyc E153D (Austausch von L-Glutaminsäure an Position 153 gegen L-Asparaginsäure), Pyc A182S (Austausch von L-Alanin an Position 182 gegen L-Serin), Pyc A206S (Austausch von L-Alanin an Position 206 gegen L-Serin), Pyc H227R (Austausch von L-Histidin an Position 227 gegen L-Arginin), Pyc A455G (Austausch von L-Alanin an Position 455 gegen Glycin), und Pyc D1120E (Austausch von L-Asparaginsäure an Position 1120 gegen L-Glutaminsäure). In gleicher weise kann das in der EP 1 108 790 beschrieben pyc-Allel verwendet werden, das für eine Pyruvat-Carboxylase kodiert, welche den Aminosäureaustausch Pyc P458S (Austausch von L-Prolin an Position 458 gegen L-Serin) enthält.

Unter ausgeschalteter oder abgeschwächter Aktivität versteht man die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität oder Konzentration eines oder mehrerer Enzyme bzw. Proteine in einem Mikroorganismus, die

durch das entsprechende Polynukleotid beziehungsweise DNA kodiert werden.

Zur Erzeugung eines Stammes, in dem die intrazelluläre Aktivität eines gewünschten Polypeptids ausgeschaltet ist, wird eine Deletion oder Insertion von mindestens einer (1) Nukleobase, bevorzugt von einer (1) oder von zwei (2) Nukleobasen, in die Kodierregion des entsprechenden Gens, eingebaut. Es ist gleichfalls möglich mindestens ein (1) oder auch mehrere Kodon(e) innerhalb der Kodierregion zu deletieren. Diese Massnahmen führen zu einer Verschiebung des Leserasters („frame shift mutations") und damit typischerweise zur Synthese eines funktionsunfähigen Polypeptids. In gleicher Weise wirkt die Einführung einer Nichtsinnmutation („nonsense mutation") durch Transversion oder Transition von mindestens einer (1) Nukleobase innerhalb der Kodierregion. Aufgrund des entstandenen Stop-Kodons kommt es zu einem vorzeitigem Abbruch der Translation. Die genannten Massnahmen werden bevorzugt in der Region zwischen dem Startkodon und dem vorletzten kodierenden Kodon, besonders bevorzugt im 5'-terminalen Teil der Kodierregion, durchgeführt, welcher für den N-Terminus des Polypeptids kodiert. Bezeichnet man die Gesamtlänge eines Polypeptids (gemessen als Anzahl der chemisch verbundenen L-Aminosäuren) mit 100%, so gehört - im Rahmen der vorliegenden Erfindung - zum N-Terminus des Polypeptids der Teil der Aminosäuresequenz, welcher, gerechnet ab der Start-Aminosäure L-Formyl-Methionin 80% der nachfolgenden L-Aminosäuren enthält.

Genetische Massnahmen zur Ausschaltung der Malat-Chinon Oxidoreduktase (Mqo) sind beispielsweise in der US 7,094,106 beschrieben.

Genetische Massnahmen zur Ausschaltung der Malat-Dehydrogenase (Mdh) sind beispielsweise in der WO 02/02778 beschrieben.

Genetische Massnahmen zur Ausschaltung der E1p Untereinheit (AceE) des Pyruvat-Dehydrogenase Komplexes sind

beispielsweise in der EP 06119615 und bei Schreiner et al. (Journal of Bacteriology 187(17), 6005-6018 (2005)) beschrieben.

Es ist gleichfalls möglich durch geeignete Aminosäureaustausche die katalytische Eigenschaft des betreffenden Polypeptides zu senken.

Im Falle der Malat-Chinon Oxidoreduktase (Mqo) kann dies, wie in der WO 06/077004 beschrieben, dadurch erzielt werden, dass man Allele des mqo-Gens herstellt bzw. verwendet, welche für eine Mqo-Variante kodieren, die die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:24 besitzt und einen oder mehrere Aminosäureaustausche ausgewählt aus der Gruppe

a) Austausch des L-Serins an Position 111 gegen eine andere proteinogene Aminosäure, bevorzugt L-Phenylalanin oder L-Alanin, und

b) Austausch des L-Alanin an Position 201 gegen eine andere proteinogene Aminosäure, bevorzugt L-Serin,

enthält.

Ganz besonders bevorzugt werden Stämme die ein mqo-Allel enthalten, das für eine Mqo-Variante kodiert, welche die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:24 besitzt, wobei an Position 111 L-Phenylalanin enthalten ist.

Durch die Maßnahmen der Ausschaltung oder Abschwächung wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen auf 0 bis 75%, 0 bis 50%, 0 bis 25%, 0 bis 10% oder 0 bis 5% der Aktivität oder Konzentration des Wildtyp-Proteins, beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangsstamm bzw. Elternstamm herabgesenkt.

Die Leistung der erfindungsgemäß hergestellten Bakterien der Gattung Corynebacterium bzw. des Fermentationsprozesses unter Verwendung derselben bezüglich eines oder mehrerer der Parameter ausgewählt aus der Gruppe der L-Aminosäure-

Konzentration (gebildete L-Aminosäure pro Volumen), der L-Aminosäure-Ausbeute (gebildete L-Aminosäure pro verbrauchter Kohlenstoff-Quelle), der L-Aminosäure-Bildung (gebildete L-Aminosäure pro Volumen und Zeit) und der spezifischen L-Aminosäure-Bildung (gebildete L-Aminosäure pro Zelltrockenmasse bzw. Biotrockenmasse und Zeit oder gebildete L-Aminosäure pro Zellprotein und Zeit) oder auch anderer Prozess-Parameter und Kombinationen davon, wird um mindestens 0,5%, mindestens 1%, mindestens 1,5% oder mindestens 2% bezogen auf den Ausgangstamm bzw. Elternstamm bzw. den Fermentationsprozess unter Verwendung derselben erhöht.

Die erfindungsgemäß hergestellten Bakterien der Gattung Corynebacterium können kontinuierlich - wie beispielsweise in der PCT/EP2004/008882 beschrieben- oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung bzw. Satzverfahren) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion der gewünschten L-Aminosäuren kultiviert werden. Eine Zusammenfassung allgemeiner Art über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) verfügbar.

Das zu verwendende Kulturmedium beziehungsweise Fermentationsmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology„ der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Die Begriffe Kulturmedium und Fermentationsmedium beziehungsweise Medium sind gegenseitig austauschbar.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Saccharose-haltige Lösungen aus der Zuckerrüben- oder Zuckerrohrherstellung, Stärke, Stärkehydrolysat und Cellulose, Öle und Fette, wie zum Beispiel Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren, wie zum Beispiel Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie zum Beispiel Glycerin, Methanol und Ethanol und organische Säuren, wie zum Beispiel Essigsäure oder Milchsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden.

Das Kulturmedium muß weiterhin Salze beispielsweise in Form von Chloriden oder Sulfaten von Metallen wie beispielsweise Natrium, Kalium, Magnesium, Calcium und Eisen enthalten, wie zum Beispiel Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren beispielsweise Homoserin und Vitamine beispielsweise Thiamin, Biotin oder Pantothensäure zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden.

Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak beziehungsweise Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie

Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Der pH wird im Allgemeinen auf einen Wert von 6,0 bis 9,0 vorzugsweise 6,5 bis 8 eingestellt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel, wie zum Beispiel Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete, selektiv wirkende Stoffe, wie zum Beispiel Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff-haltige Gasmischungen, wie zum Beispiel Luft in die Kultur eingetragen. Die Verwendung von Flüssigkeiten, die mit Wasserstoffperoxid angereichert sind, ist ebenfalls möglich. Gegebenenfalls wird die Fermentation bei Überdruck, beispielsweise bei einem Druck von 0,03 bis 0,2 MPa, gefahren. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Bei batch-Verfahren wird die Kultivierung solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum der gewünschten L-Aminosäure, gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht. Bei kontinuierlichen Verfahren sind längere Kultivierungszeiten möglich. Durch die Tätigkeit der Bakterien kommt es zu einer Anreicherung (Akkumulation) der L-Aminosäure im Fermentationsmedium und/oder in den Bakterienzellen.

Beispiele für geeignete Fermentationsmedien finden sich unter anderem in den Patentschriften 5,770,409, US 5,840,551 und US 5,990,350 oder US 5,275,940.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Anionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Gegenstand der Erfindung ist demzufolge auch ein Verfahren zur Herstellung einer L-Aminosäure, dadurch gekennzeichnet, dass man folgende Schritte durchführt:

a) Fermentation der erfindungsgemäßen Bakterien in einem geeignetem Nährmedium,

b) Akkumulation der L- Aminosäure in dem Nährmedium oder in den Zellen der genannten Bakterien.

Daran schließt sich im Allgemeinen das Sammeln (collecting) der im Nährmedium bzw. in der Fermentationsbrühe oder in den Zellen der Bakterien akkumulierten L-Aminosäure an, um zu einem festen oder flüssigen Produkt zu gelangen.

Unter einer Fermentationsbrühe versteht man ein Fermentationsmedium bzw. Nährmedium, in dem ein Mikroorganismus für eine gewisse Zeit und bei einer gewissen Temperatur kultiviert wurde. Das Fermentationsmedium beziehungsweise die während der Fermentation eingesetzten Medien enthält/enthalten sämtliche Substanzen beziehungsweise Komponenten, die eine Vermehrung des Mikroorganismus und eine Bildung der gewünschten Aminosäure sicherstellen.

Bei Abschluss der Fermentation enthält die entstandene Fermentationsbrühe dementsprechend a) die infolge der Vermehrung der Zellen des Mikroorganismus entstandene Biomasse (Zellmasse) des Mikroorganismus, b) die im Laufe der Fermentation gebildete gewünschte L-Aminosäure wie L-Lysin, L-Valin oder L-Isoleucin c) die im Laufe der Fermentation gebildeten organischen Nebenprodukte und d) die durch die Fermentation nicht verbrauchten Bestandteile des eingesetzten Fermentationsmediums beziehungsweise der Einsatzstoffe wie beispielsweise Vitamine wie Biotin, Aminosäuren wie Homoserin oder Salze wie Magnesiumsulfat.

Zu den organischen Nebenprodukte gehören Stoffe, die von den bei der Fermentation eingesetzten Mikroorganismen gegebenenfalls neben der jeweiligen erwünschten organisch-

chemischen Verbindung erzeugt und gegebenenfalls ausgeschieden werden. Hierzu gehören auch Zucker wie zum Beispiel Trehalose.

Im Falle der Aminosäuren L-Valin und L-Isoleucin wird eine Isolierung und Reinigung, beispielsweise unter Verwendung einer oder mehrerer Verfahren ausgewählt aus der Gruppe chromatographische Verfahren, Kristallisationsverfahren und Verwendung von Aktivkohle, bevorzugt, so dass weitgehend reine Produkte, beispielsweise solche mit einer Reinheit von ≥90 Gew.-% oder ≥95 Gew.-% erhalten werden.

Im Falle der Aminosäure L-Lysin sind im Stand der Technik im wesentlichen vier verschiedene Produktformen bekannt.

Eine Gruppe L-Lysin-haltiger Produkte umfasst konzentrierte, wässrige, alkalische Lösungen von aufgereinigtem L-Lysin (EP-B-0534865). Eine weitere Gruppe, wie beispielsweise in der US 6,340,486 und US 6,465,025 beschrieben, umfasst wässrige, saure, Biomasse-haltige Konzentrate von L-Lysin-haltigen Fermentationsbrühen. Die bekannteste Gruppe fester Produkte umfasst pulverförmige oder kristalline Formen von aufgereinigtem beziehungsweise reinem L-Lysin, das typischerweise in Form eines Salzes wie zum Beispiel L-Lysin-Monohydrochlorid vorliegt. Eine weitere Gruppe fester Produktformen ist beispielsweise in der EP-B-0533039 beschrieben. Die dort beschriebene Produktform enthält neben L-Lysin den größten Teil der während der fermentativen Herstellung verwendeten und nicht verbrauchten Einsatzstoffe und gegebenfalls die Biomasse des eingesetzten Mikroorganismus mit einem Anteil von >0% - 100%.

Entsprechend der verschiedenen Produktformen kennt man verschiedenste Verfahren, bei denen das L-Lysin aus der Fermentationsbrühe gesammelt, isoliert oder gereinigt wird, um das L-Lysin-haltige Produkt oder das gereinigte L-Lysin herzustellen.

Zur Herstellung von festem, reinen L-Lysin werden im wesentlichen Methoden der Ionenaustauschchromatographie gegebenfalls unter Verwendung von Aktivkohle und Methoden der Kristallisierung angewendet. Auf diese Weise erhält man die entsprechende Base oder ein entsprechendes Salz wie beispielsweise das Monohydrochlorid (Lys-HCl) oder das Lysinsulfat (Lys_2-H_2SO_4).

In der EP-B-0534865 ein Verfahren zur Herstellung wässriger, basischer L-Lysin-haltiger Lösungen aus Fermentationsbrühen beschrieben. Bei dem dort beschriebenen Verfahren wird die Biomasse aus der Fermentationsbrühe abgetrennt und verworfen. Mittels einer Base wie beispielsweise Natrium-, Kalium- oder Ammoniumhydroxid wird ein pH-Wert zwischen 9 bis 11 eingestellt. Die mineralischen Bestandteile (anorganischen Salze) werden nach Konzentrierung und Abkühlung durch Kristallisation aus der Brühe abgetrennt und entweder als Dünger verwendet oder verworfen.

Bei Verfahren zur Herstellung von Lysin unter Verwendung der erfindungsgemäßen Bakterien werden solche Verfahren bevorzugt, bei denen Produkte erhalten werden, die Bestandteile der Fermentationsbrühe enthalten. Diese werden insbesondere als Tierfuttermitteladditive verwendet.

Je nach Anforderung kann die Biomasse ganz oder teilweise durch Separationsmethoden wie z.B. der Zentrifugation, der Filtration, dem Dekantieren oder einer Kombination hieraus aus der Fermentationsbrühe entfernt oder vollständig in ihr belassen werden. Gegebenenfalls wird die Biomasse beziehungsweise die Biomasse enthaltene Fermentationsbrühe während eines geeigneten Verfahrensschrittes inaktiviert beispielsweise durch thermische Behandlung (Erhitzen) oder durch Säurezugabe.

In einer Verfahrensweise wird die Biomasse vollständig oder nahezu vollständig entfernt, sodass keine (0 %) oder höchstens 30%, höchstens 20%, höchstens 10%, höchstens 5%, höchstens 1% oder höchstens 0,1% Biomasse im hergestellten

Produkt verbleibt. In einer weiteren Verfahrensweise wird die Biomasse nicht oder nur in geringfügigen Anteilen entfernt, sodass sämtliche (100%) oder mehr als 70%, 80%, 90%, 95%, 99% oder 99,9% Biomasse im hergestellten Produkt verbleibt. In einem erfindungsgemäßen Verfahren wird dementsprechend die Biomasse in Anteilen ≥ 0% bis ≤ 100% entfernt.

Schließlich kann die nach der Fermentation erhaltene Fermentationsbrühe vor oder nach der vollständigen oder teilweisen Entfernung der Biomasse mit einer anorganischen Säure wie beispielsweise Salzsäure, Schwefelsäure oder Phosphorsäure oder organischen Säure wie beispielsweise Propionsäure auf einen sauren pH Wert gestellt werden (GB 1,439,728 oder EP 1 331 220). Es ist gleichfalls möglich die Fermentationsbrühe mit der vollständig enthaltenen Biomasse anzusäuern. Schließlich kann die Brühe auch durch Zusatz von Natriumbisulfit ($NaHSO_3$, GB 1,439,728) oder einem anderen Salz beispielsweise Ammonium-, Alkali- oder Erdalkalisalz der schwefligen Säure stabilisiert werden.

Bei der Abtrennung der Biomasse werden gegebenenfalls in der Fermentationsbrühe enthaltene organische oder anorganische Feststoffe teilweise oder ganz entfernt. Die in der Fermentationsbrühe gelösten organischen Nebenprodukte und die gelösten nicht verbrauchten Bestandteile des Fermentationsmediums (Einsatzstoffe) bleiben mindestens teilweise (> 0%), bevorzugt zu mindestens 25%, besonders bevorzugt zu mindestens 50% und ganz besonders bevorzugt zu mindestens 75% im Produkt. Gegebenenfalls bleiben diese auch vollständig (100%) oder nahezu vollständig, das heißt > 95% oder > 98% oder größer 99%, im Produkt. Enthält ein Produkt in diesem Sinn mindestens einen Teil der Bestandteile der Fermentationsbrühe, so wird dies auch mit dem Begriff „Produkt auf Fermentationsbrühebasis“ umschrieben.

Anschließend wird der Brühe mit bekannten Methoden wie z.B. mit Hilfe eines Rotationsverdampfers,

Dünnschichtverdampfers, Fallfilmverdampfers, durch Umkehrosmose oder durch Nanofiltration Wasser entzogen beziehungsweise eingedickt oder konzentriert. Diese aufkonzentrierte Fermentationsbrühe kann anschließend durch Methoden der Gefriertrocknung, der Sprühtrocknung, der Sprühgranulation oder durch anderweitige Verfahren wie zum Beispiel in der zirkulierenden Wirbelschicht gemäß PCT/EP2004/006655 beschrieben, zu rieselfähigen Produkten insbesondere zu einem feinteiligen Pulver oder vorzugsweise grobkörnigem Granulat aufgearbeitet werden. Gegebenenfalls wird aus dem erhaltenen Granulat durch Sieben oder Staubabtrennung ein gewünschtes Produkt isoliert.

Es ist ebenfalls möglich, die Fermentationsbrühe direkt d. h. ohne vorherige Aufkonzentrierung durch Sprühtrocknung oder Sprühgranulation zu trocknen.

Unter „rieselfähig" versteht man Pulver, die aus einer Serie von Glasauslaufgefäßen mit verschieden großen Auslauföffnungen mindestens aus dem Gefäß mit der Öffnung 5 mm (Millimeter) ungehindert auslaufen (Klein: Seifen, Öle, Fette, Wachse 94, 12 (1968)).

Mit „feinteilig" ist ein Pulver mit überwiegendem Anteil (> 50 %) einer Korngröße von 20 bis 200 µm Durchmesser gemeint.

Mit „grobkörnig" ist ein Produkt mit einem überwiegendem Anteil (> 50 %) einer Korngröße von 200 bis 2000 µm Durchmesser gemeint.

Die Korngrößenbestimmung kann mit Methoden der Laserbeugungsspektrometrie durchgeführt werden. Die entsprechenden Methoden sind im Lehrbuch zur „Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis" von R. H. Müller und R. Schuhmann, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1996) oder im Lehrbuch „Introduction to Particle Technology" von M. Rhodes, Verlag Wiley & Sons (1998) beschrieben.

Das rieselfähige, feinteilige Pulver kann wiederum durch geeignete Kompaktier- oder Granulier-Verfahren in ein grobkörniges, gut rieselfähiges, lagerfähiges und weitgehend staubfreies Produkt überführt werden.

Der Begriff „staubfrei" bedeutet, daß das Produkt lediglich geringe Anteile (< 5 %) an Körngrößen unter 100 µm Durchmesser enthält.

„Lagerfähig", im Sinne dieser Erfindung, bedeutet ein Produkt, das mindestens ein (1) Jahr oder länger, bevorzugt mindestens 1,5 Jahre oder länger, besonders bevorzugt zwei (2) Jahre oder länger in trockener und kühler Umgebung gelagert werden kann, ohne dass ein wesentlicher Verlust (maximal 5%) der jeweiligen Aminosäure auftritt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren, das in seinen Grundzügen in der DE 102006016158 beschrieben ist, und bei dem die unter Verwendung der erfindungsgemäßen Mikroorganismen erhaltene Fermentationsbrühe, aus der die Biomasse gegebenenfalls ganz oder teilweise abgetrennt wurde, weiterverarbeitet wird, indem man ein Verfahren durchführt das mindestens folgende Schritte umfasst:

a) den pH-Wert durch Zugabe von Schwefelsäure auf 4,0 bis 5,2, insbesondere 4,9 bis 5,1, absenkt, und ein molares Sulfat/L-Lysin-Verhältnis von 0,85 bis 1,2, bevorzugt 0,9 bis 1,0, besonders bevorzugt >0,9 bis <0,95, in der Brühe einstellt, gegebenenfalls durch Zugabe von einer weiteren oder mehreren Sulfat-haltigen Verbindung(n) und

b) das so erhaltene Gemisch durch Wasserentzug aufkonzentriert, und gegebenenfalls granuliert,

wobei gegebenenfalls vor Schritt a) eine oder beide der folgenden Massnahmen durchgeführt wird/werden:

c) Messung des molaren Verhältnisses von Sulfat/L-Lysin zur Ermittlung der benötigten Menge an Sulfat-haltigen Verbindung(n)

d) Zusatz einer Sulfat-haltigen Verbindung ausgewählt aus der Gruppe Ammoniumsulfat, Ammoniumhydrogensulfat und Schwefelsäure in entsprechenden Verhältnissen.

Gegebenenfalls wird weiterhin vor Schritt b) ein Salz der schwefligen Säure, bevorzugt Alkalihydrogensulfit, besonders bevorzugt Natriumhydrogensulfit in einer Konzentration von 0,01 bis 0,5 Gew.-%, bevorzugt 0,1 bis 0,3 Gew.-%, besonders bevorzugt 0,1 bis 0,2 Gew.-% bezogen auf die Fermentationsbrühe hinzugesetzt.

Als bevorzugte Sulfat-haltigen Verbindungen im Sinne der oben genannten Verfahrensschritte sind insbesondere Ammoniumsulfat und/oder Ammoniumhydrogensulfat oder entsprechende Mischungen von Ammoniak und Schwefelsäure und Schwefelsäure selbst zu nennen.

Das molare Sulfat/L-Lysin-Verhältnis V wird nach der Formel: $V = 2 \times [SO_4^{2-}] / [\text{L-Lysin}]$ berechnet. Diese Formel berücksichtigt die Tatsache, dass das SO_4^{2-} Anion, bzw. die Schwefelsäure zweiwertig ist. Ein Verhältnis V = 1 bedeutet, dass ein stöchiometrisch zusammengesetztes (Lys_2-H_2SO_4) vorliegt, während bei einem Verhältnis von V = 0,9 ein 10%iger Sulfatmangel und bei einem Verhältnis von V = 1,1 ein 10% Sulfatüberschuss gefunden wird.

Vorteilhaft bei der Granulation oder Kompaktierung ist der Einsatz von üblichen organischen oder anorganischen Hilfsstoffen, beziehungsweise Trägern wie Stärke, Gelatine, Cellulosederivaten oder ähnlichen Stoffen, wie sie üblicherweise in der Lebensmittel- oder Futterverarbeitung als Binde-, Gelier-, oder Verdickungsmittel Verwendung finden, oder von weiteren Stoffen wie zum Beispiel Kieselsäuren, Silikaten (EP0743016A) Stearaten.

Weiterhin ist es vorteilhaft die Oberfläche der erhaltenen Granulate mit Ölen zu behandeln so wie es in der WO 04/054381 beschrieben ist. Als Öle können Mineralöle, pflanzliche Öle oder Mischungen pflanzlicher Öle verwendet werden. Beispiele für derartige Öle sind Sojaöl, Olivenöl,

Sojaöl/Lecithingemische. In gleicher Weise sind auch Silikonöle, Polyethylenglykole oder Hydroxyethylcellulose geeignet. Durch die Behandlung der Oberflächen mit den genannten Ölen erzielt man eine erhöhte Abriebfestigkeit des Produktes und einen Verringerung des Staubanteils. Der Gehalt an Öl im Produkt beträgt 0,02 bis 2,0 Gew.-%, bevorzugt 0,02 bis 1,0 Gew.-%, und ganz besonders bevorzugt 0,2 bis 1,0 Gew.-% bezogen auf die Gesamtmenge des Futtermitteladditivs.

Bevorzugt sind Produkte mit einem Anteil von ≥ 97 Gew.-% einer Korngröße von 100 bis 1800 µm oder einem Anteil von ≥ 95 Gew.-% einer Korngröße von 300 bis 1800 µm Durchmesser. Der Anteil an Staub d. h. Partikeln mit einer Korngrösse < 100 µm liegt bevorzugt bei > 0 bis 1 Gew.- besonders bevorzugt bei maximal 0,5 Gew.-%.

Alternativ kann das Produkt aber auch auf einen in der Futtermittelverarbeitung bekannten und üblichen organischen oder anorganischen Trägerstoff wie zum Beispiel Kieselsäuren, Silikate, Schrote, Kleien, Mehle, Stärken, Zucker oder andere aufgezogen und/oder mit üblichen Verdickungs- oder Bindemitteln vermischt und stabilisiert werden. Anwendungsbeispiele und Verfahren hierzu sind in der Literatur (Die Mühle + Mischfuttertechnik 132 (1995) 49, Seite 817) beschrieben.

Schließlich kann das Produkt auch durch Beschichtungsverfahren („Coating") mit Filmbildnern wie beispielsweise Metallcarbonate, Kieselsäuren, Silikate, Alginate, Stearate, Stärken, Gummis und Celluloseether, wie in der DE-C-4100920 beschrieben, in einen Zustand gebracht werden, in dem es stabil gegenüber der Verdauung durch Tiermägen insbesondere dem Magen von Wiederkäuern ist.

Zur Einstellung einer gewünschten L-Lysin Konzentration im Produkt kann je nach Anforderung das L-Lysin während des Verfahrens in Form eines Konzentrates oder gegebenenfalls einer weitgehend reinen Substanz beziehungsweise dessen Salz in flüssiger oder fester Form hinzugefügt werden.

Diese können einzeln oder als Mischungen zur erhaltenen oder aufkonzentrierten Fermentationsbrühe, oder auch während des Trocknungs- oder Granulationsprozesses hinzugefügt werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines festen Lysin-haltigen Produktes, wie es in seinen Grundzügen in der US 20050220933 beschrieben ist, und das die Aufarbeitung der unter Verwendung der erfindungsgemäßen Mikroorganismen erhaltenen Fermentationsbrühe in folgenden Schritten umfasst:

a) Filtration der Fermentationsbrühe, bevorzugt mit einem Membranfilter, so dass ein Biomasse-haltiger Schlamm und ein Filtrat erhalten wird,

b) Aufkonzentration des Filtrates, bevorzugt so, dass ein Feststoffgehalt von 48 bis 52 Gew.-% erhalten wird,

c) Granulation des in Schritt b) erhaltenen Konzentrates, bevorzugt bei einer Temperatur von 50°C bis 62°C, und

d) Beschichtung des in c) erhaltenen Granulates mit einem oder mehreren der Beschichtungsmittel (coating agent(s))

Zur Beschichtung in Schritt d) werden bevorzugt Beschichtungsmittel verwendet, welche ausgewählt werden aus der Gruppe, bestehend aus

d1) der in Schritt a) erhaltenen Biomasse,

d2) einer L-Lysin-haltigen Verbindung, bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe L-Lysinhydrochlorid oder L-Lysinsulfat,

d3) einem im wesentlichen L-Lysin-freien Stoff mit L-Lysingehalt < 1 Gew.-%, bevorzugt < 0,5 Gew.-%, bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe Stärke, Karageenan, Agar, Kieselsäuren, Silikate, Schrote, Kleien und Mehle, und

d4) einem wasserabstoßenden Stoff, bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe Öle, Polyethylenglykole und flüssige Paraffine.

Durch die Massnahmen entsprechend den Schritten d1) bis d4), insbesondere d1) bis d3), wird der Gehalt an L-Lysin auf einen gewünschten Wert eingestellt.

Bei der Herstellung L-Lysin-haltiger Produkte wird das Verhältnis der Ionen bevorzugt so eingestellt, dass das molare Ionenverhältnis entsprechend nachstehender Formel

$$2x[SO_4^{2-}]+[Cl^-]-[NH_4^+]-[Na^+]-[K^+]-2x[Mg^{2+}]-2x[Ca^{2+}]/[L\text{-}Lys]$$

0,68 bis 0,95, bevorzugt 0,68 bis 0,90 ergibt, so wie von Kushiki et al. in der US 20030152633 beschrieben.

Im Falle des Lysins hat das auf diese Weise hergestellte feste Produkt auf Fermentationsbrühebasis einen Lysingehalt (als Lysinbase) von 10 Gew.-% bis 70 Gew.-% oder 20 Gew.-% bis 70 Gew.-%, bevorzugt 30 Gew.-% bis 70 Gew.-% und ganz besonders bevorzugt von 40 Gew.-% bis 70 Gew.-% bezogen auf die Trockenmasse des Produkts. Maximale Gehalte an Lysinbase von 71 Gew.-% , 72 Gew.-%, 73 Gew.-% sind ebenfalls möglich.

Der Wassergehalt des L-Lysin-haltigen, festen Produktes beträgt bis zu 5 Gew.-%, bevorzugt bis zu 4 Gew.-%, und besonders bevorzugt weniger als 3 Gew.-%.

Beispiel 1

Sequenzierung des gltA-Gens des Stammes DM678

Der Stamm Corynebacterium glutamicum DM678 (US 6,861,246) ist ein Lysin-Produktionsstamm, der durch Mutagenese und Screening entwickelt wurde. Er ist auxotroph für L-Threonin und L-Methionin-sensitiv. Der Stamm wurde bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) als DSM12866 hinterlegt.

Aus dem Stamm DM678 wurde mit der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) chromosomale DNA isoliert. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurde ein DNA-Abschnitt amplifiziert, welcher das gltA-Gen trägt. Hierfür wurden folgende Oligonukleotide als Primer verwendet:

gltA_XL-A1 (SEQ ID NO: 27):
5` tgagttctattggcgtgacc 3`

gltA_XL-E1 (SEQ ID NO: 28):
5` ttcgccaacgatgatgtcag 3`

Die dargestellten Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Sie ermöglichen die Amplifizierung eines ca. 1,8 kb langen DNA-Abschnittes, welcher das gltA-Gen trägt. Der Primer gltA_XL-A1 bindet an die Region entsprechend Position 490 bis 509 des zu SEQ ID NO: 3 (und SEQ ID NO: 7) komplementären Stranges. Der Primer gltA_XL-E1 bindet an die Region ensprechend Position 2266 bis 2247 des Stranges gemäß SEQ ID NO: 3 (und SEQ ID NO: 7).

Die PCR-Reaktion wurde mit der Phusion High Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde nach Herstellerangaben angesetzt und enthielt bei 50 µl Gesamt-Volumen 10 µl des mitgelieferten 5 x Phusion HF Buffer, Desoxynucleosidtriphosphate in einer Konzentration von jeweils 200 µM, Primer in einer Konzentration von 0,5 µM,

ungefähr 50 ng Template-DNA und 2 Units Phusion Polymerase. Durch Zugabe von H_2O wurde das Volumen auf 50 µl eingestellt.

Der PCR-Ansatz wurde zuerst einer einleitenden Denaturierung bei 98°C für 30 Sekunden unterzogen. Darauf folgten sich 35x wiederholend ein Denaturierungsschritt bei 98°C für 20 Sekunden, ein Schritt zum Binden der Primer an die vorgelegte DNA bei 60°C für 20 Sekunden und der Extensionsschritt zur Verlängerung der Primer bei 72°C für 60 Sekunden. Nach dem abschliessenden Extensionsschritt für 5 Minuten bei 72°C wurde der PCR-Ansatz einer Agarosegel-Elektrophorese (0,8% Agarose) unterworfen. Ein DNA-Fragment von ca. 1,8 kb Länge wurde identifiziert, aus dem Gel isoliert und unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen, (Hilden, Deutschland) aufgereinigt.

Die Nukleotidsequenz des amplifizierten DNA-Fragmentes bzw. PCR-Produktes wurde von der Firma Agowa (Berlin, Deutschland) bestimmt.

Die Nukleotidsequenz der Kodierregion des gltA-Allels aus dem Stamm DM678 enthält an Position 14 die Nukleobase Thymin. Das Gen des Wildtyps (siehe SEQ ID NO: 1) enthält an dieser Position die Nukleobase Adenin. Diese Adenin-Thymin Transversion führt zu einem Aminosäureaustausch von Aspartat zu Valin an Position 5 der resultierenden Aminosäuresequenz. Diese Mutation wird im Folgenden als gltAD5V bezeichnet. Das Allel gltAD5V ist in SEQ ID NO: 5 dargestellt, die sich mit Hilfe des Programmes Patentin ergebende Aminosäuresequenz des Proteins ist in der SEQ ID NO: 6 dargestellt.

Beispiel 2

Konstruktion des Austauschvektors pK18mobsacB_gltAD5V

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurde ein DNA-Fragment amplifiziert, das einen Teil der „upstream-Region" des gltA-Gens sowie einen Teil der Kodierregion, welcher

die Mutation gltAD5V enthält, trägt. Als Template wurde die in Beispiel 1 gewonnene chromosomale DNA von DM678 verwendet. Folgende Oligonukleotide wurden als Primer für die PCR ausgewählt:

gltA_1.p (SEQ ID NO: 29):

5` CCGTCGACAATAGCCTGAA 3`

gltA_2.p (SEQ ID NO: 30):
5` CC-GAATTC-TTCGAGCATCTCCAGAAC 3`

Sie wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und ermöglichen die Amplifizierung eines ca. 1,7 kb langen DNA-Abschnittes, enthaltend 832 bp der upstream-Region und die Nukleotide 1-855 bp der Kodierregion des gltA-Gens aus DM678.

Der Primer gltA_1.p bindet an die Region entsprechend Position 169 bis 187 des zu SEQ ID NO: 25 komplementären Stranges. Die Nukleotide 9 bis 26 des Primers gltA_2.p binden an die Region ensprechend Position 1855 bis 1838 des Stranges gemäß SEQ ID NO: 25. Außerdem enthält der Primer gltA_1.p die native Schnittstelle des Restriktionsenzyms SalI und der Primer gltA_2.p die Sequenz der Schnittstelle des Restriktionsenzyms EcoRI, die in der oben dargestellten Nukleotidabfolge jeweils durch Unterstreichen markiert sind.

Die PCR-Reaktion wurde mit der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) durchgeführt. Der Reaktionsansatz hatte die oben beschriebene Zusammensetzung. Die PCR wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die Nukleotidsequenz des ca. 1,7 kb langen Amplifikates ist in SEQ ID NO: 31 dargestellt.

Das Amplifikat wurde mit den Restriktionsendonukleasen SalI und EcoRI behandelt und durch Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel identifiziert. Es wurde anschließend aus dem Gel isoliert und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen aufgereinigt.

Das dergestalt gereinigte DNA-Fragment enthält die beschrieben gltAD5V-Mutation und besitzt kompatible Enden zu mit SalI bzw. EcoRI geschnittener DNA (gltAD5V-Fragment bzw. gltA` in Figur 1). Es wurde anschließend in den von Schäfer et al. (Gene, 145, 69-73 (1994)) beschriebenen, mobilisierbaren Vektor pK18mobsacB kloniert, um einen Allel- beziehungsweise Mutationsaustausch zu ermöglichen. Hierzu wurde pK18mobsacB mit den Restriktionsenzymen EcoRI und SalI verdaut und die Enden mit alkalischer Phosphatase (Alkaline Phosphatase, Boehringer Mannheim, Deutschland) dephosphoryliert. Der so vorbereitete Vektor wurde mit dem gltAD5V-Fragment gemischt und der Ansatz mit dem Ready-To-Go T4 DNA Ligase Kit (Amersham-Pharmacia, Freiburg, Deutschland) behandelt.

Anschließend wurde der E.coli Stamm S17-1 (Simon et al.,Bio/Technologie 1: 784-791, 1993) mit dem Ligationsansatz transformiert (Hanahan, In. DNA cloning. A practical approach. Vol.1. ILR-Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989). Die Selektion auf Plasmid-tragende Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Tansformationsansatzes auf LB-Agar (Sambrook et al., Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor, New York, 1989), der mit 25 mg/l Kanamycin supplementiert worden war.

Plasmid-DNA wurde aus einer Transformante mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen isoliert und durch Restriktionsspaltung mit den Enzymen SalI und EcoRI und anschließender Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Das Plasmid wurde pK18mobsacB_gltAD5V genannt und ist in Figur 1 dargestellt.

Beispiel 3

Einbau der Mutation gltAD5V in den Stamm Corynebacterium glutamicum DM1797

Die Mutation gltAD5V soll in den Stamm Corynebacterium glutamicum DM1797 eingebracht werden. Der Stamm DM1797 ist eine Aminoethylcystein-resistente Mutante von

Corynebacterium glutamicum ATCC13032 und in der PCT/EP/2005/012417 beschrieben. Sie ist unter der Bezeichnung DSM16833 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) hinterlegt.

Der in Beispiel 2 beschriebene Vektor pK18mobsacB_gltAD5V wurde nach dem Protokoll von Schäfer et al. (Journal of Microbiology 172: 1663-1666 (1990)) in den C. glutamicum Stamm DM1797 durch Konjugation transferiert. Der Vektor kann in DM1797 nicht selbständig replizieren und bleibt nur dann in der Zelle erhalten, wenn er als Folge eines Rekombinationsereignisses im Chromosom integriert vorliegt. Die Selektion von Transkonjuganten, d. h. von Klonen mit integriertem pK18mobsacB_gltAD5V erfolgte durch Ausplattieren des Konjugationsansatzes auf LB-Agar, der mit 25 mg/l Kanamycin und 50 mg/l Nalidixinsäure supplementiert worden war. Kanamycin-resistente Transkonjuganten wurden anschließend auf mit Kanamycin (25 mg/l) supplementierten LB-Agarplatten ausgestrichen und für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Zur Selektion von Mutanten, bei denen als Folge eines zweiten Rekombinationsereignisses die Exzision des Plasmides stattgefunden hatte, wurden die Klone 30 Stunden unselektiv in LB-Flüssigmedium kultiviert, anschließend auf LB-Agar, der mit 10% Sucrose supplementiert worden war ausgestrichen und 24 Stunden bei 33°C bebrütet.

Das Plasmid pK18mobsacB_gltAD5V enthält ebenso wie das Ausgangsplasmid pK18mobsacB neben dem Kanamycin-Resistenzgen eine Kopie des für die Levan-Sucrase aus Bacillus subtilis kodierenden sacB-Gens. Die durch Sucrose induzierbare Expression des sacB-Gens führt zur Bildung der Levan-Sucrase, welche die Synthese des für C. glutamicum toxischen Produktes Levan katalysiert. Auf mit Sucrose supplementiertem LB-Agar wachsen daher nur solche Klone, bei denen das integrierte pK18mobsacB_gltAD5V als Folge eines zweiten Rekombinationsereignisses exzisiert wurde. In Abhängigkeit von der Lage des zweiten Rekombinationsereignisses in bezug auf den Mutationsort

findet bei der Exzision der Allelaustausch bzw. der Einbau der Mutation statt oder es verbleibt die ursprüngliche Kopie im Chromosom des Wirtes.

Anschließend wurde ein Klon gesucht, bei dem der gewünschte Austausch, d. h. der Einbau der Mutation gltAD5V, erfolgt war. Hierzu wurde von 10 Klonen mit dem Phänotyp „Wachstum in Gegenwart von Sucrose" und „Nicht-Wachstum in Gegenwart von Kanamycin" die Sequenz des gltA-Gens bestimmt. Auf diese Weise wurde ein Klon identifiziert, der die Mutation gltAD5V trägt. Dieser Stamm wurde als C. glutamicum DM1797_gltAD5V bezeichnet.

Beispiel 4

Produktion von L-Lysin

Der in Beispiel 3 erhaltene Stamm DM1797_gltAD5V und der Ausgangsstamm DM1797 wurden in einem zur Produktion von Lysin geeigneten Nährmedium kultiviert und der Lysingehalt im Kulturüberstand bestimmt.

Dazu wurden die Klone zunächst auf Hirn-Herz-Agarplatten (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 24 Stunden bei 33°C vermehrt. Ausgehend von diesen Agarplattenkulturen wurde je eine Vorkultur angeimpft (10 ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die Vorkulturen wurde das Medium MM verwendet. Die Vorkulturen wurden 24 Stunden bei 33°C und 240 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Von diesen Vorkulturen wurde je eine Hauptkultur angeimpft, so dass die Anfangs-OD (660 nm) der Hauptkultur 0,1 OD betrug. Für die Hauptkulturen wurde ebenfalls das Medium MM verwendet.

Medium MM

CSL	5 g/l
MOPS	20 g/l
Glucose (getrennt autoklaviert)	50 g/l

Salze:

$(NH_4)_2SO_4$)	25 g/l
KH_2PO_4	0,1 g/l
$MgSO_4$ * 7 H_2O	1,0 g/l
$CaCl_2$ * 2 H_2O	10 mg/l
$FeSO_4$ * 7 H_2O	10 mg/l
$MnSO_4$ * H_2O	5,0mg/l
Biotin (sterilfiltriert)	0,3 mg/l
Thiamin * HCl (sterilfiltriert)	0,2 mg/l
$CaCO_3$	25 g/l

CSL (Corn Steep Liquor), MOPS (Morpholinopropansulfonsäure) und die Salzlösung wurden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend wurden die sterilen Substrat- und Vitaminlösungen sowie das trocken autoklavierte $CaCO_3$ zugesetzt.

Die Kultivierung erfolgte in Volumina von 10 ml, die in 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen enthalten waren. Die Temperatur betrug bei 33°C, die Umdrehungszahl war 250 rpm und die Luftfeuchte 80%.

Nach 48 Stunden wurde die optische Dichte (OD) bei einer Meßwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, München) bestimmt. Die gebildete Lysinmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion bestimmt.

Tabelle 1

Stamm	OD(660)	Lysin-HCl (g/l)
DM1797	11,9	4,8
DM1797_gltAD5V	11,2	5,3

Beispiel 5

Einbau der Mutation gltAD5V in den Stamm Brevibacterium lactofermentum FERM BP-1763

Die Mutation gltAD5V soll in den Stamm Brevibacterium lactofermentum FERM BP-1763 eingebracht werden. Der Stamm FERM BP-1763 ist ein Mycophenolsäure-resistenter Valin-Produzent (US-A-5,188,948). Er ist auxotroph für L-Isoleucin und L-Methionin.

Der in Beispiel 2 beschriebene Vektor pK18mobsacB_gltAD5V wurde nach dem Protokoll von Schäfer et al. (Journal of Microbiology 172: 1663-1666 (1990)) in den Stamm FERM-BP-1763 durch Konjugation transferiert. Der Vektor kann in FERM BP-1763 nicht selbständig replizieren und bleibt nur dann in der Zelle erhalten, wenn er als Folge eines Rekombinationsereignisses im Chromosom integriert vorliegt. Die Selektion von Transkonjuganten, d. h. von Klonen mit integriertem pK18mobsacB_gltAD5V erfolgte durch Ausplattieren des Konjugationsansatzes auf LB-Agar, der mit 25 mg/l Kanamycin und 50 mg/l Nalidixinsäure supplementiert worden war. Kanamycin-resistente Transkonjuganten wurden anschließend auf mit Kanamycin (25 mg/l) supplementierten LB-Agarplatten ausgestrichen und für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Zur Selektion von Mutanten, bei denen als Folge eines zweiten Rekombinationsereignisses die Exzision des Plasmides stattgefunden hatte, wurden die Klone 30 Stunden unselektiv in LB-Flüssigmedium kultiviert, anschließend auf

LB-Agar, der mit 10% Sucrose supplementiert worden war ausgestrichen und 24 Stunden bei 33°C bebrütet.

Das Plasmid pK18mobsacB_gltAD5V enthält ebenso wie das Ausgangsplasmid pK18mobsacB neben dem Kanamycin-Resistenzgen eine Kopie des für die Levan-Sucrase aus Bacillus subtilis kodierenden sacB-Gens. Die durch Sucrose induzierbare Expression des sacB-Gens führt zur Bildung der Levan-Sucrase, die die Synthese des für C. glutamicum toxischen Produktes Levan katalysiert. Auf mit Sucrose supplementiertem LB-Agar wachsen daher nur solche Klone, bei denen das integrierte pK18mobsacB_gltAD5V als Folge eines zweiten Rekombinationsereignisses exzisiert wurde. In Abhängigkeit von der Lage des zweiten Rekombinationsereignisses in bezug auf den Mutationsort findet bei der Exzision der Allelaustausch bzw. der Einbau der Mutation statt oder es verbleibt die ursprüngliche Kopie im Chromosom des Wirtes.

Anschließend wurde ein Klon gesucht, bei dem der gewünschte Austausch, d. h. der Einbau der Mutation gltAD5V, erfolgt war. Hierzu wurde von 10 Klonen mit dem Phänotyp „Wachstum in Gegenwart von Sucrose" und „Nicht-Wachstum in Gegenwart von Kanamycin" die Sequenz des gltA-Gens bestimmt. Auf diese Weise wurde ein Klon identifiziert, der die Mutation gltAD5V trägt. Dieser Stamm wurde als C. glutamicum FERM BP-1763_gltAD5V bezeichnet.

Beispiel 6

Produktion von L-Valin

Der in Beispiel 5 erhaltene Stamm FERM BP-1763_gltAD5V und der Ausgangsstamm FERM BP-1763 wurden in einem zur Produktion von Valin geeigneten Nährmedium kultiviert und der Valingehalt im Kulturüberstand bestimmt.

Dazu wurden die Klone zunächst auf Hirn-Herz-Agarplatten (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 24 Stunden bei 33°C vermehrt. Ausgehend von diesen Agarplattenkulturen wurde je

eine Vorkultur angeimpft (10 ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben).

Das Medium CgIII (2.5 g/l NaCl, 10 g/l Bacto-Pepton, 10 g/l Bacto-Yeast Extrakt, pH 7.4, 20 g/l Glukose (getrennt autoklaviert) wurde für die Vorkulturen verwendet. Die Vorkulturen wurden 24 Stunden bei 33°C und 240 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Von diesen Vorkulturen wurde je eine Hauptkultur angeimpft, so dass die Anfangs-OD (660 nm) der Hauptkultur 0,1 OD betrug. Für die Hauptkulturen wurde ebenfalls Medium MM verwendet.

Medium MM

CSL	5 g/l
MOPS	20 g/l
Glucose (getrennt autoklaviert)	50 g/l
Salze:	
$(NH_4)_2SO_4$)	25 g/l
KH_2PO_4	0,1 g/l
$MgSO_4$ * 7 H_2O	1,0 g/l
$CaCl_2$ * 2 H_2O	10 mg/l
$FeSO_4$ * 7 H_2O	10 mg/l
$MnSO_4$ * H_2O	5,0mg/l
Isoleucin (sterilfiltriert)	0,1 g/l
Methionin (sterilfiltriert)	0,1 g/l
Leucin (sterilfiltriert)	0,1 g/l
Thiamin * HCl (sterilfiltriert)	0,2 mg/l
$CaCO_3$	25 g/l

CSL (Corn Steep Liquor), MOPS (Morpholinopropansulfonsäure) und die Salzlösung wurden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend wurden die sterilen Substrat- und Vitaminlösungen sowie das trocken autoklavierte $CaCO_3$ zugesetzt.

Die Kultivierung erfolgte in Volumina von 10 ml, die in 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen enthalten waren. Die Temperatur betrug bei 33°C, die Umdrehungszahl war 250 rpm und die Luftfeuchte 80%.

Nach 48 Stunden wurde die optische Dichte (OD) bei einer Meßwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, München) bestimmt. Die gebildete Valinmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion bestimmt.

Tabelle 2

Stamm	OD(660)	Valin (g/l)
FERM BP-1763	8,4	11,9
FERM BP-1763_dltAD5V	7,8	12,6

Kurze Beschreibung der Figur:

Figur 1: Karte des Plasmids pK18mobsacB_gltAD5V

Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung. Bei der Angabe der Basenpaarzahlen handelt es sich um Näherungswerte, die im Rahmen der Reproduzierbarkeit von Messungen erhalten werden.

Kan:	Kanamycin Resistenz-Gen
SalI:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms SalI
EcoRI:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms EcoRI
gltA´:	kloniertes DNA-Fragment enthaltend die Mutation gltAD5V
sacB:	sacB-Gen
RP4-mob:	mob-Region mit dem Replikationsursprung für den Transfer (oriT)
oriV:	Replikationsursprung V

Ansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, welches die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2 umfasst, wobei die L-Asparaginsäure an Position 5 der Aminosäuresequenz durch eine andere proteinogene Aminosäure ersetzt ist und wobei das Polypeptid Citratsynthase Aktivität besitzt.

2. Das isolierte Polynukleotid gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid einen oder mehrere konservative Aminosäuraustausch(e) enthält, wobei die Citratsynthase-Aktivität des Polypeptids im wesentlichen unverändert bleibt.

3. Das isolierte Polynukleotid gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die proteinogene Aminosäure an Position 5 L-Valin, L-Isoleucin oder L-Leucin ist.

4. Das isolierte Polynukleotid gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die proteinogene Aminosäure L-Valin ist.

5. Das isolierte Polynukleotid gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Polynukleotid die Nukleotidsequenz von SEQ ID NO:5 besitzt.

6. Isoliertes Polynukleotid, das eine Nukleotidsequenz umfasst, welche von Position 1 bis 39 die Nukleotidsequenz entsprechend Position 1 bis 39 von SEQ ID NO:11 enthält und von Position 40 bis 105 eine Nukleotidsequenz enthält, die für die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:12 kodiert, wobei an Position 5 eine proteinogenen Aminosäuren ausgenommen L-Asparaginsäure enthalten ist.

7. Das isolierte Polynukleotid gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die proteinogene Aminosäure L-Valin, L-Isoleucin oder L-Leucin ist.

8. Das isolierte Polynukleotid gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die proteinogene Aminosäure L-Valin ist.

9. Das isolierte Polynukleotid gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass es die Nukleotidsequenz von Position 263 bis 1263 von SEQ ID NO:7 umfasst.

10. Vektor, der ein Polynukleotid gemäß den Ansprüchen 1 bis 9 enthält.

11. Bakterium, das mit dem Vektor gemäß Anspruch 10 transformiert worden ist.

12. Das Bakterium gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um ein Bakterium der Gattung Corynebacterium oder Escherichia handelt.

13. Das Bakterium gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Corynebacterium glutamicum oder Escherichia coli handelt.

14. Bakterium der Gattung Corynebacterium, das ein Polynukleotid gemäß den Ansprüchen 1 bis 13 enthält.

15. Das Bakterium gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Corynebacterium glutamicum handelt.

16. Rekombinantes Bakterium der Gattung Corynebacterium welches ein Polynukleotid enthält, das für ein Polypeptid mit Citratsynthase-Aktivität kodiert, welches die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2 umfasst, wobei an Position 5 der Aminosäuresequenz eine der proteinogenen Aminosäuren ausgenommen L-Asparaginsäure enthalten ist.

17. Das rekombinante Bakterium der Gattung Corynebacterium gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid einen oder mehrere konservative Aminosäuraustausch(e) enthält, wobei die

Citratsynthase-Aktivität des Polypeptids im wesentlichen unverändert bleibt.

18. Das rekombinante Bakterium der Gattung Corynebacterium gemäß Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass die proteinogene Aminosäure L-Valin, L-Isoleucin oder L-Leucin ist.

19. Das rekombinante Bakterium der Gattung Corynebacterium gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die proteinogene Aminosäure L-Valin ist.

20. Das rekombinante Bakterium der Gattung Corynebacterium gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass das Polynukleotid die Nukleotidsequenz von SEQ ID NO:5 besitzt.

21. Das rekombinante Bakterium der Gattung Corynebacterium gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 12 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass es ein Polynukleotid enthält, das für ein Polypeptid mit Aspartatkinase-Aktivität kodiert, welches die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:20 umfasst, und einen oder mehrere der Aminosäureaustausche ausgewählt aus der Gruppe

a) Austausch von L-Alanin an Position 279 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 20 gegen L-Threonin (LysC A279T),

b) Austausch von L-Alanin an Position 279 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 20 gegen L-Valin (LysC A279V),

c) Austausch von L-Leucin an Position 297 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 20 gegen L-Glutamin (LysC L297Q),

d) Austausch von L-Serin an Position 301 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 20 gegen L-Phenylalanin (LysC S301F),

e) Austausch von L-Serin an Position 301 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 20 gegen L-Tyrosin (LysC S301Y),

f) Austausch von L-Threonin an Position 308 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 20 gegen L-Isoleucin (LysC T308I),

g) Austausch von L-Threonin an Position 311 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 20 gegen L-Isoleucin (LysC T311I),

h) Austausch von L-Serin an Position 317 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 20 gegen L-Alanin (LysC S317A),

i) Austausch von L-Arginin an Position 320 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 20 gegen Glycin (LysC R320G),

j) Austausch von Glycin an Position 345 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 20 gegen L-Asparaginsäure (LysC G345D),

k) Austausch von L-Threonin an Position 380 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 20 gegen L-Isoleucin (LysC T380I), und

l) Austausch von L-Serin an Position 381 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 20 gegen L-Phenylalanin (LysC S381F).

22. Das rekombinante Bakterium der Gattung Corynebacterium gemäß Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass das Polynukleotid, das für ein Polypeptid mit Aspartatkinase-Aktivität kodiert, überexprimiert wird.

23. Das rekombinante Bakterium der Gattung Corynebacterium gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 12 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass es zusätzlich eines oder

mehrere der Merkmale ausgewählt aus der Gruppe besitzt:

a) überexprimiertes Polynukleotid, das für eine Dihydrodipicolinat-Synthase (DapA)kodiert,

b) überexprimiertes Polynukleotid, das für eine Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase (Asd) kodiert,

c) überexprimiertes Polynukleotid, das für eine Diaminopimelat-Decarboxylase (LysA) kodiert,

d) überexprimiertes Polynukleotid, das für eine Aspartat-Aminotransferase (Aat) kodiert,

e) überexprimiertes Polynukleotid, das für ein Polypeptid mit L-Lysin-Export Aktivität (LysE) kodiert,

f) ausgeschaltete oder abgeschwächte Aktivität der Malat-Dehydrogenase (Mdh),

g) ausgeschaltete oder abgeschwächte Aktivität der Malat-Chinon Oxidoreduktase (Mqo),

h) überexprimiertes Polynukleotid, das für eine Pyruvat-Carboxylase (Pyc) kodiert, und

i) ausgeschaltete oder abgeschwächte Aktivität der E1p Untereinheit des Pyruvat-Dehydrogenase Komplexes (AceE).

24. Das rekombinante Bakterium der Gattung Corynebacterium gemäß Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass es sämtliche der Merkmale a) bis g) enthält.

25. Das rekombinante Bakterium der Gattung Corynebacterium gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 15 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Corynebacterium glutamicum handelt.

26. Verfahren zur Herstellung einer L-Aminosäure, dadurch gekennzeichnet, dass man folgende Schritte durchführt:

a) Fermentation der Bakterien gemäß einem oder mehreren der Ansprüchen 15 bis 25 in einem geeignetem Nährmedium,

b) Akkumulation der L- Aminosäure in dem Nährmedium oder in den Zellen der genannten Bakterien.

27. Verfahren gemäß Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der L-Aminosäure um L-Lysin, L-Valin oder L-Isoleucin handelt.

28. Verfahren gemäß Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der L-Aminosäure um L-Lysin handelt.

29. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 25 - 28, dadurch gekennzeichnet, dass man die L-Aminosäure sammelt.

30. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 25 - 29, dadurch gekennzeichnet, dass man die L-Aminosäure isoliert und reinigt.

31. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 26 - 29, dadurch gekennzeichnet, dass Bestandteile der Fermentationsbrühe und/oder Biomasse in ihrer Gesamtheit oder in Anteilen (> 0 bis 100%) im Endprodukt verbleiben.

32. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 26 - 28, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um ein Satzverfahren handelt.

33. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 26 - 28, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um ein Zulaufverfahren handelt.

34. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 26 - 28, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um ein kontinuierliches Verfahren handelt.

35. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass man einer L-Lysin haltigen Fermentationsbrühe Wasser entzieht und ein Produkt mit einem Wassergehalt von maximal 5 Gew.-% erhält.

36. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass man eine L-Lysin haltige Fermentationsbrühe zunächst konzentriert und anschließend sprühtrocknet oder sprühgranuliert.

37. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass man folgende Schritte durchführt

a) den pH-Wert durch Zugabe von Schwefelsäure auf 4,0 bis 5,2 absenkt, und ein molares Sulfat/L-Lysin-Verhältnis von 0,85 bis 1,2 in der Brühe einstellt, gegebenenfalls durch Zugabe von weiteren Sulfat-haltigen Verbindung(n) und

b) das so erhaltene Gemisch durch Wasserentzug aufkonzentriert, und gegebenenfalls granuliert.

38. Verfahren gemäß Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, dass als Sulfat-haltige Verbindung Ammoniumsulfat und/oder Ammoniumhydrogensulfat oder Schwefelsäure und Ammoniak in entsprechenden Verhältnissen zugesetzt werden.

39. Verfahren gemäß Anspruch 37 oder 38, dadurch gekennzeichnet, dass vor Schritt a) das Verhältnis Sulfat/L-Lysin gemessen wird zur Ermittlung der benötigten Menge an Sulfat-haltigen Verbindungen.

40. Verfahren nach einem der Ansprüche 36 bis 39, dadurch gekennzeichnet, dass man die Oberfläche des erhaltenen Granulats mit einem Öl behandelt.

41. Verfahren gemäß Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich folgende weitere Schritte durchgeführt werden:

c) Filtration der Fermentationsbrühe, bevorzugt mit einem Membranfilter, so dass ein Biomasse-haltiger Schlamm und ein Filtrat erhalten wird,

d) Aufkonzentration des Filtrates, bevorzugt so, dass ein Feststoffgehalt von 48 bis 52 Gew.-% erhalten wird,

e) Granulation des in Schritt d) erhaltenen Konzentrates, bevorzugt bei einer Temperatur von 50°C bis 62°C, und

f) Beschichtung des in e) erhaltenen Granulates mit einem oder mehreren Beschichtungsmittel(n).

42. Verfahren gemäß Anspruch 41, dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere Beschichtungsmittel ausgewählt aus der Gruppe

f1) der in Schritt c) erhaltenen Biomasse,

f2) einer L-Lysin-haltigen Verbindung, bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe L-Lysinhydrochlorid oder L-Lysinsulfat,

f3) einem im wesentlichen L-Lysin-freien Stoff mit einem L-Lysingehalt < 1 Gew.-%, bevorzugt < 0,5 Gew.-%, bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe Stärke, Karageenan, Agar, Kieselsäuren, Silikate, Schrote, Kleien und Mehle, und

f4) einem wasserabstoßenden Stoff, bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe Öle, Polyethylenglykole und flüssige Paraffine

eingesetzt werden.

Figur 1:

Karte des Plasmids pK18mobsacB_gltAD5V

