



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 11 2007 001 179 T5 2009.04.02

(12)

## Veröffentlichung

der internationalen Anmeldung mit der

(87) Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2007/131750**

in deutscher Übersetzung (Art. III § 8 Abs. 2 IntPatÜG)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **11 2007 001 179.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP2007/004249**

(86) PCT-Anmeldetag: **15.05.2007**

(87) PCT-Veröffentlichungstag: **22.11.2007**

(43) Veröffentlichungstag der PCT Anmeldung  
in deutscher Übersetzung: **02.04.2009**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12P 13/02 (2006.01)**

(30) Unionspriorität:  
**06010054.2 16.05.2006 EP**

(74) Vertreter:  
**Lederer & Keller, 80538 München**

(71) Anmelder:  
**DSM IP Assets B.V., Heerlen, NL**

(72) Erfinder:  
**Ferrandez, Abel, Basel, CH; Perkins, John B., Wassenaar, NL; Flores-Candia, Juana-Lucia, Bettingen, NL; Schyns, Ghislain, Aesch, CH**

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Herstellung von Panthenol**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zur Herstellung von Panthenol durch das Kultivieren eines Mikroorganismus, der mindestens ein Enzym, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den Enzymen in der Pantoatbiosynthese und PanC, überexprimieren kann, unter geeigneten Kultivierungsbedingungen unter gleichzeitiger Einspeisung von 3-Aminopropanol oder einem geeigneten Derivat davon und gegebenenfalls Gewinnen des Panthenols aus dem Zellkultivierungsmedium.

**Beschreibung**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung von Panthenol. Genauer gesagt, bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Panthenol durch Kultivieren eines Mikroorganismus in einem geeigneten Fermentationsmedium unter geeigneten Fermentationsbedingungen unter gleichzeitiger Einspeisung von 3-Aminopropanol (AMP) oder einem Derivat davon und nach Bedarf Gewinnung des Panthenols.

**[0002]** Panthenol ist 2,4-Dihydroxy-N-(3-hydroxypropyl)-3,3-dimethylbutyramid oder N-Pantoyl-3-propanolamin, wobei der Alkohol Pantothensäure entspricht. Aufgrund seiner Membranschützenden Eigenschaften wird Panthenol verbreitet in der Kosmetikindustrie genutzt. Die D(+)- oder R-Form von Panthenol, die in Verbindung mit der vorliegenden Erfindung die bevorzugte Form ist, verfügt über Vitaminaktivität, und seine Verwendung als Prophylaxemittel im Bereich der Medizin sowie als Nahrungsergänzung ist daher wohl begründet, und es werden stetig neue Anwendungen entwickelt.

**[0003]** Das herkömmliche Herstellungsverfahren von Panthenol ist die chemische Kondensation von synthetischem R-Pantolacton ( $\alpha$ -Hydroxy- $\beta,\beta$ -dimethyl- $\gamma$ -butyrolacton) mit 3-Aminopropanol (siehe z. B. Schnider, O.: Synthesis of Panthenol and its transformation into pantothenic acid. Jubiläumsband Emil Barell 1946, 85–91).

**[0004]** Bisher ist kein Verfahren zur Herstellung von Panthenol durch ein biotechnologisches Verfahren unter Verwendung von Mikroorganismen beschrieben worden.

**[0005]** CN 1367253 beschreibt die Herstellung von D-Panthenol durch mikrobielle enzymatische Hydrolyse von DL-Pantoinsäurelacton unter Verwendung von Fusarium moniliforme, das D-Pantoinsäurelactonhydrolase erzeugt, und Umsetzen der resultierenden D-Pantoinsäure mit 3-Aminopropanol.

**[0006]** Die vollständige oder teilweise Biosynthese von Panthenol bei niedrigeren Herstellungskosten als bei den bekannten chemischen Verfahren ist noch immer ein attraktives technisches Ziel, das es zu erreichen gilt.

**[0007]** Die vollständige oder teilweise Biosynthese von Panthenol bei niedrigeren Herstellungskosten als bei den bekannten chemischen Verfahren ist noch immer ein attraktives technisches Ziel, das es zu erreichen gilt.

**[0008]** EP 859 848 B1 (BASF AG) beansprucht ein Verfahren zur Herstellung von D-Pantothensäure, wobei das Verfahren das Kultivieren einer Transformante von *E. coli* in Gegenwart von  $\beta$ -Alanin umfaßt. WO 01/21772 (Omnigene Bioproducts/BASF AG) beansprucht ein Verfahren zur Herstellung von Pantothenat oder Pantoat durch Kultivieren genetisch modifizierter Mikroorganismen der Gattung *Bacillus*, speziell *B. subtilis*, worin mindestens ein Enzym, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus PanB (Ketopantothydroxymethyltransferase), PanC (Pantothenatsynthetase), PanD (Aspartat- $\alpha$ -decarboxylase) und PanE (Ketopantoatreduktase), überexprimiert wird.

**[0009]** Während PanC in einem Mikroorganismus unter Bildung von Pantothenat bekanntermaßen die Kondensation von  $\beta$ -Alanin mit Pantoat katalysiert, ist nunmehr überraschend herausgefunden worden, daß PanC unter Bildung von Panthenol auch die Kondensation von 3-Aminopropanol mit Pantoat katalysieren kann.

**[0010]** Daher bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein Verfahren zur Herstellung von Panthenol, gekennzeichnet durch das Kultivieren eines Mikroorganismus, der mindestens ein Enzym, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den Enzymen in der Pantoatbiosynthese und PanC, überexprimieren kann, unter geeigneten Kultivierungsbedingungen unter gleichzeitiger Einspeisung von 3-Aminopropanol oder einem geeigneten Derivat davon und gegebenenfalls Gewinnen des Panthenols aus dem Zellkultivierungsmedium.

**[0011]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf Panthenol, ob nun gemäß einem solchen Verfahren hergestellt oder nicht, und auf die Verwendung von PanC oder einer Mutante davon mit erhöhter katalytischer Aktivität in einem Verfahren zur Herstellung von Panthenol aus 3-Aminopropanol oder einem Derivat davon und Pantoat.

**[0012]** Der Mikroorganismus der vorliegenden Erfindung kann eukaryotisch oder prokaryotisch sein. Bevorzugt ist der Mikroorganismus prokaryotisch. Der prokaryotische Mikroorganismus kann Gram-positiv oder Gram-negativ sein. Gram-positive Mikroorganismen umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Mikroorganismen, die zu einer der Gattungen *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* und *Streptomyces* gehören. Bevorzugt gehört der Mikroorganismus zur Gattung *Bacillus*. Beispiele sind *Bacillus licheniformis*, *Ba-*

cillus amyloliquefaciens, Bacillus subtilis, Bacillus puntis, Bacillus halodurans usw. Am stärksten bevorzugt ist der Mikroorganismus Bacillus subtilis.

**[0013]** Die Enzyme des Pantoat-Biosyntheseweges – sowie der DNA-Sequenzen, die für diese kodieren – sind einem Fachmann bekannt und umfassen ohne Einschränkung PanB, PanE, ilvB, ilvC, ilvD, ilvN, GlyA, SerA und SerC sowie die Enzyme des Glycin-Spaltungsweges.

**[0014]** In bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung wird mindestens eines der Enzyme PanB, PanC, PanE und ilvD überexprimiert. In einer weiteren speziellen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird PanD, das unter Bildung von  $\beta$ -Alanin die  $\alpha$ -Decarboxylierung von Aspartat katalysiert, durch die teilweise oder vollständige Deletion des entsprechenden PanD-Gens inaktiviert.

**[0015]** In der Literatur werden viele spezifische genetisch manipulierte und transformierte Mikroorganismen beschrieben, die eines oder mehrere Enzyme des Pantoat-Biosyntheseweges überexprimieren oder die mikrobielle Produktion von Pantoat steigern und daher in der vorliegenden Erfindung, gegebenenfalls nach Einführung zusätzlicher vorteilhafter Änderungen, verwendet werden können. Beispiele für Veröffentlichungen solcher Mikroorganismen in der Patentliteratur sind: WO 97/10340, EP 1 001 027, EP 1 006 189, WO 01/21772, WO 01/92556, EP 1 167 520, WO 02/24936, WO 02/29020, WO 02/055711, WO 02/057474, WO 02/057476, WO 02/061108, WO 02/064806, WO 02/072838, WO 02/072840, WO 02/072854, WO 02/072855, EP 1 247 868, WO 03/004672, WO 03/006664, DE 102 01 540 A1, WO 03/029476, WO 2004/005525 und WO 2004/005527.

**[0016]** Unter dem Ausdruck „überexprimieren“ oder „Überexprimierung“ ist die Exprimierung eines Genproduktes zu einem höheren Niveau als dem, der vor der Modifikation des Mikroorganismus oder in einem vergleichbaren Mikroorganismus, der nicht modifiziert worden ist, exprimiert wird. In einer Ausführungsform überexprimiert der Mikroorganismus der Erfindung eines oder mehrere Gen(e), ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus panB, panC, panE, ilvB, ilvC, ilvD, ilvN, glyA, serA und serC, und die gcv-Gene, die in den Glycin-Spaltungswege involviert sind, sowie Mutanten davon, was zur Synthese kodierter Enzyme mit verbesserten katalytischen Eigenschaften führt.

**[0017]** Unter dem Ausdruck „dereguliert“ oder „Deregulation“ ist eine derartige Veränderung oder Modifikation eines Gens in einem Mikroorganismus zu verstehen, daß der Gehalt oder die Aktivität des Genproduktes in einem Mikroorganismus verändert oder modifiziert wird. Bevorzugt wird mindestens ein Gen so verändert oder modifiziert, daß das Genprodukt gesteigert/erhöht oder vermindert/verringert wird.

**[0018]** Die Überexpression oder Deregulation eines Gens in einem Mikroorganismus kann gemäß irgendeiner in der Technik bekannten Methodologie durchgeführt werden. In einer Ausführungsform kann der Mikroorganismus genetisch manipuliert, z. B. genetisch verändert werden. Die genetische Manipulation kann das Verändern oder Modifizieren von Regulationssequenzen oder -stellen, die mit der Expression eines speziellen Gens assoziiert sind, z. B. durch Zugabe starker Promotoren, induzierbarer Promotoren oder mehrerer Promotoren, oder durch Entfernen von Regulationssequenzen, so daß die Expression konstitutiv ist, das Modifizieren der Chromosomenlokation eines speziellen Gens, das Verändern von Nukleinsäuresequenzen neben einem speziellen Gen wie einer Ribosomenbindungsstelle oder eines Transkriptionsterminators, Erhöhung der Kopienzahl eines speziellen Gens, Modifizieren von Proteinen, z. B. Regulationsproteinen, Suppressoren, Enhancern, Transkriptionsaktivatoren und dergleichen, involviert in die Transkription eines speziellen Gens und/oder die Translation eines speziellen Genproduktes, oder irgendwelche anderen herkömmlichen Mittel zur Deregulation der Expression eines speziellen Gens, die in der Technik üblich sind (einschließlich, aber nicht beschränkt auf die Verwendung von Antisense-Nukleinsäuremolekülen, z. B. zur Blockierung der Expression von Repressorproteinen) umfassen, ist aber nicht darauf beschränkt. Beispiele für geeignete Promotoren sind  $P_{veg}$ ,  $P_{15}$  und  $P_{26}$ , sind aber nicht darauf beschränkt (Lee et. al., 1980, Mol. Gen. Genet. 180: 57–65 und Moran et. al., 1982, Mol. Gen. Genet. 186: 339–46).

**[0019]** Alternativ kann der Mikroorganismus physikalisch oder umwelttechnisch so manipuliert werden, das er den Gehalt an Genprodukt überexprimiert, der größer ist als der vor der Manipulation des Mikroorganismus oder in einem vergleichbaren Mikroorganismus, der nicht manipuliert worden ist, exprimierte. Beispielsweise kann ein Mikroorganismus mit einem Mittel, das bekanntermaßen oder vermutlich die Transkription eines speziellen Gens und/oder die Translation eines speziellen Genproduktes erhöht, behandelt oder in dessen Gegenwart so kultiviert werden, daß die Transkription und/oder Translation gesteigert oder erhöht wird. Ferner kann ein Mikroorganismus bei einer Temperatur, die so gewählt wurde, daß die Transkription eines speziellen Gens und/oder Translation eines speziellen Genproduktes erhöht wird, so kultiviert werden, daß die Transkription

und/oder Translation gesteigert oder erhöht wird.

**[0020]** Der Ausdruck „Kultivieren eines Mikroorganismus unter geeigneten Kultivierungsbedingungen“ bezieht sich auf Verfahren zur Erhaltung und/oder zum Züchten eines lebenden Mikroorganismus der vorliegenden Erfindung, die in der Technik allgemein bekannt sind. Die Mikroorganismen können in flüssigen, festen oder halbfesten Medien kultiviert werden. Bevorzugt wird der Mikroorganismus der Erfindung in flüssigen Medien kultiviert, die Nährstoffe umfassen, die zur Erhaltung und/oder zum Züchten des Mikroorganismus essentiell oder nützlich sind. Solche Nährstoffe umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Kohlenstoffquellen oder Kohlenstoffsubstrate, wie Alkohole, Zucker, Zuckeralkohole, komplexe Kohlenhydrate wie Stärken, Kohlenwasserstoffe, Fettsäuren, andere organische Säuren; Öle, Fette; Stickstoffquellen, zum Beispiel Pflanzenproteine, Hefeextrakt, Peptone, Peptide und Aminosäuren, die aus Körnern, Bohnen und Knollen oder aus tierischen Quellen wie Fleisch oder Milch, Fleischextrakten und Kaseinhydrolysaten stammen; anorganische Stickstoffquellen wie Harnstoff, Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumnitrat und Ammoniumphosphat; Phosphorquellen, z. B. Phosphorsäure und Natrium- oder Kaliumsalze davon; Spurenelemente, z. B. Magnesium-, Eisen-, Mangan-, Calcium-, Kupfer-, Zink-, Bor-, Molybdän- und/oder Kobaltsalze; sowie Wachstumsfaktoren wie Vitamine, Wachstums promotoren und dergleichen.

**[0021]** Die Mikroorganismen werden bevorzugt unter kontrolliertem pH kultiviert. In einer Ausführungsform werden die Mikroorganismen bei einem pH zwischen 6,0 und 8,5, stärker bevorzugt einem pH von etwa 7 kultiviert. Der gewünschte pH kann durch ein Verfahren aufrechterhalten werden, das einem Fachmann bekannt ist.

**[0022]** Bevorzugt werden die Mikroorganismen ferner unter kontrollierter Belüftung und unter kontrollierten Temperaturen kultiviert. In einer Ausführungsform umfassen die kontrollierten Temperaturen Temperaturen zwischen 15 und 70°C, bevorzugt liegen die Temperaturen zwischen 20 und 55°C, stärker bevorzugt zwischen 30 und 45°C oder zwischen 30 und 50°C.

**[0023]** Die Mikroorganismen können in flüssigen Medien entweder kontinuierlich, halbkontinuierlich oder diskontinuierlich durch herkömmliche Kultivierungsverfahren wie Stehkultur, Teströhrenkultur, Schüttelkultur, Lüftungsdrehkultur (aeration spinner culture) oder Fermentation kultiviert werden. Bevorzugt werden die Mikroorganismen in einem Fermenter kultiviert. Die Fermentationsverfahren der Erfindung umfassen Batch-, Fed-Batch- und kontinuierliche Fermentationsverfahren. Es ist eine Vielzahl solcher Verfahren entwickelt worden und in der Technik allgemein bekannt.

**[0024]** Das Kultivieren wird üblicherweise so lange durchgeführt, bis die gewünschte Menge an Panthenol erzeugt worden ist.

**[0025]** Das wesentliche Merkmal der Kultivierung der Mikroorganismen gemäß der vorliegenden Erfindung ist das gleichzeitige Einspeisen von 3-Aminopropanol (AMP) oder einem geeigneten Derivat davon. Geeignete Derivate von AMP sind die, die unter den Kultivierungsbedingungen in AMP umgewandelt werden, wie 3-Alkoxypropylamine, bevorzugt 3-Methoxy- oder 3-Ethoxy-propylamine, 3-Halogenpropylamine, z. B. 3-Chlorpropyl-amin, oder 3-Aminopropanthiol.

**[0026]** Obgleich bakterielle Kulturen innerhalb von 72 h angelegt wurden, wurden die Modalitäten der AMP-Co-Einspeisung sowohl für die Schüttelkolben- als auch die Fermentationsexperimente gewissenhaft an jede Art von Panthenol-Herstellungsexperiment angepaßt. In Schüttelkolben wurde AMP dem Wachstumsmedium zum Zeitpunkt der Inokulation und mit einer Konzentration von 40 g/l zugegeben. Während der Fed-Batch-Fermentation folgte einer ersten 24-h-Wachstumsphase, die ohne gleichzeitige AMP-Einspeisung durchgeführt wurde, die Einspeisung von AMP während 24 h bei 14 g/l. Diese AMP-Einspeisung wurde dann für die letzten 24 h des Wachstums erhöht. In beiden Fällen ist es wichtig, den pH durch Neutralisation mit HCl konstant zu halten (der pH betrug 7,2 für Schüttelkolbenexperimente und 6,8 für Rührkesselfermentation).

**[0027]** In einer speziellen Ausführungsform der Erfindung kann die Ausbeute an mikrobiell erzeugtem Panthenol durch gleichzeitige oder periodische Co-Einspeisung von Pantoinsäure, einem geeigneten Pantoinsäurederivat oder einem Präcursor von Pantoat in den Biosyntheseweg erhöht werden. Die optimale Menge einer solchen Co-Einspeisung unter den speziellen Kultivierungsbedingungen kann leicht durch Routineexperimente bestimmt werden.

**[0028]** Das gemäß der vorliegenden Erfindung erhaltene Panthenol in der Fermentationsbrühe kann entweder ohne Gewinnung oder nach der Gewinnung verwendet werden. Der Ausdruck „Gewinnung“ umfaßt das

Isolieren, Extrahieren, Ernten, Trennen oder Reinigen der Verbindung aus dem Kulturmedium. Das Isolieren der Verbindung kann gemäß einer herkömmlichen Isolations- oder Reinigungsmethodologie, die in der Technik bekannt ist, durchgeführt werden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Behandlung mit einem herkömmlichen Harz, Behandlung mit einem herkömmlichen Adsorbens, Änderung des pH, Lösungsmittlextraktion, Dialyse, Filtration, Konzentration, Kristallisation, Umkristallisation, pH-Einstellung und dergleichen. Beispielsweise kann die Panthenolverbindung aus dem Kulturmedium gewonnen werden, indem zunächst die Mikroorganismen aus der Kultur entfernt werden. Die Lösung wird dann durch oder über ein Kationenaustauschharz geführt, um unerwünschte Kationen zu entfernen, und dann durch oder über ein Anionenaustauschharz, um unerwünschte anorganische Anionen und organische Säuren zu entfernen.

**[0029]** Die Erfindung wird durch die folgende Beschreibung der allgemeinen Methodologie sowie durch nicht einschränkende spezielle Beispiele weiter veranschaulicht.

#### Allgemeine Methodologie

**[0030]** Stämme und Plasmide. Die *Bacillus subtilis*-Stämme der vorliegenden Erfindung stammen aus Stamm 1A747 (Bacillus Genetic Stock Center, The Ohio State University, Columbus, Ohio 43210 USA), welcher ein prototropes Derivat von *B. subtilis* 168 (trpC2) ist (GenBank AL009126). Die Chloramphenicol-Resistenzgenkassette (cat) wurde aus Plasmid pC194 erhalten (GenBank M19465, Kat. # 1 E17, Bacillus Genetic Stock Center, The Ohio State University, Columbus, Ohio 43210 USA). Das *S. aureus*-Erythromyzin-Resistenzgen (GenBank V01278) wurde aus Plasmid pDG646 amplifiziert (Guerout-Fleury et. al., 1995). Das *S. aureus*-Spectinomyzin-Resistenzgen (XO3216) wurde aus Plasmid pDG1726 amplifiziert (Guerout-Fleury et. al., 1995). Die P<sub>15</sub>- und P<sub>26</sub>-Promotoren des *B. subtilis*-Bakteriophagen SPO1 (Lee et. al., 1980, Mol. Gen. Genet. 180: 57–65) wurden aus Derivaten von Plasmid pXI2 erhalten (Hümbelin et. al., 1999, J. Ind. Microbiol. Biotech. 22: 1–7), die SPO1-15- und SPO1-26-Promotoren aus RB50::[pRF69]::[pRF93] enthalten (Perkins et. al., 1999, J. Ind. Microbiol. Biotech. 22: 8–18).

**[0031]** Medien. Standard-Minimalmedium (MM) für *B. subtilis* enthält 1 X Spizizen-Salze, 0,04% Natriumglutamat und 0,5% Glucose. Festes Standard-Vollmedium ist Tryptone-Blood-Agar-Kulturlösung (TBAB, Difco). Flüssiges Standard-Vollmedium ist Veal-Infusion-Hefeextrakt-Kulturlösung (VY). Die Zusammensetzungen dieser Medien werden nachstehend beschrieben:

TBAB-Medium: 33 g Difco Tryptone Blood Agar Base (Katalog # 0232), 1 l Wasser. Autoklav.

VY-Medium: 25 g Difco-Veal-Infusion-Kulturlösung (Katalog # 0344), 5 g Difco Hefeextrakt (Katalog # 0127), 1 l Wasser. Autoklav.

Minimalmedium (MM): 100 ml 10 X Spizizen-Salze; 10 ml 50% Glucose; 1 ml 40%iges Natriumglutamat, qsp 1 l Wasser.

10 X Spizizen-Salze: 140 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 20 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 60 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 g Na<sub>3</sub>-Citrat·2H<sub>2</sub>O; 2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; qsp 1 l mit Wasser.

10 X VFB-Minimalmedium (10 X VFB-MM): 2,5 g Na-Glutamat; 15,7 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 15,7 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 27,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O; 40 g NH<sub>4</sub>Cl; 1 g Zitronensäure; 68 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; qsp 1 l Wasser.

Spurenelementelösung: 1,4 g MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O; 0,4 g CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 0,15 g (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O; 0,1 g AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O; 0,075 g CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; qsp 200 ml Wasser

Fe-Lösung: 0,21 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; qsp 10 ml Wasser.

CaCl<sub>2</sub>-Lösung: 15,6 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; qsp 500 ml Wasser.

Mg/Zn-Lösung: 100 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,4 g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; qsp 200 ml Wasser.

VFB-MM-Medium: 100 ml 10 X VFB-MM; 10 ml 50% Glucose; 2 ml Spurenelementelösung; 2 ml Fe-Lösung; 2 ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung; 2 ml Mg/Zn-Lösung; 882 ml steriles destilliertes Wasser.

VFB-MMGT-Medium: 100 ml 10 X VFB-MM; 100 ml 0,5 M Tris (pH 6,8); 44 ml 50%ige Glucose; 2 ml Spurenelementelösung; 2 ml Fe-Lösung; 2 ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung; 2 ml Mg/Zn-Lösung; 748 ml steriles destilliertes Wasser.

VF-Fermentations-Batch-Medium: Sterilisiert vor Ort in Lösung: 0,75 g Natriumglutamat; 4,71 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 4,71 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 8,23 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O; 0,23 g NH<sub>4</sub>Cl; 1,41 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 11,77 g Hefeextrakt (Merck); 0,2 ml Balsidon-Entschäumer; qsp 1 l.

Als autoklavierte Lösung in den Fermenter gegeben: 27,3 g Glucose·H<sub>2</sub>O; qsp 1 l.

Als Filter-sterilierte Lösung in den Fermenter gegeben: 2 ml Spurenelementelösung; 2 ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung; 2 ml Mg/Zn-Lösung; 2 ml Fe-Lösung; qsp 1 l.

VF-Fermentations-Speisemedium: 660 g Glucose·H<sub>2</sub>O; qsp 1 l. Autoklav. Zugabe von 2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 14,6 mg MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O; 4 mg ZnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O; qsp 1 l (autoklaviert).

VYS-Medium (g/l): Veal-Infusion-Kulturlösung, 30; Hefeextrakt, 5; Sorbitol, 10; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,5. Dieses Medium wurde in der ersten Stufe der Impfkultur verwendet.

Co-Einspeisungsmedien: Stammlösungen aus Pantoat und 3-Aminopropanol wurden mit Endkonzentrationen

von 415 g/l bzw. 980 g/l hergestellt.

**[0032]** Molekular- und Gentechniken. Standard-Gen- und -Molekularbiologietechniken sind in der Technik allgemein bekannt und sind bereits beschrieben worden. DNA-Transformation, PBS1-generalisierte Transduktion und andere Standard-B. subtilis-Gentechniken sind auch allgemein in der Technik bekannt und bereits beschrieben worden (Harwood und Cutting, 1992).

**[0033]** Fermentationen. Die Stämme wurden in Rührkesselfermentern, zum Beispiel New Brunswick 20 Liter-Gefäßen, die anfänglich 6 Liter VF-Fermentations-Batch-Medium mit Glucose/Salzlösung enthielten, gezüchtet. Die Computersteuerung erfolgte durch die kommerzielle NBS Biocommand 32-Software (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ, USA); Lucullus-Software (Biospektral AG, Schlieren, Schweiz) wurde zur Datensammlung und Kontrolle der Glucoseeinspeisung verwendet.

**[0034]** Zur Herstellung der Impfkultur für die Fermentation wurde ein Zwei-Impfkultur-Protokoll verwendet. In der ersten Stufe wurden 2 ml Stammkultur, zuvor hergestellt und bei  $-25^{\circ}\text{C}$  konserviert, in 25 ml VYS-Kulturlösung in einen 100-ml-Erlenmeyerkolben inkuliert, was dann für 3 h bei  $39^{\circ}\text{C}$  auf einem Rundschüttler bei 200 U/min inkubiert wurde. In der zweiten Stufe wurden 0,1 ml dieser Kultur in 300 ml der Herstellungsmedien überführt. Diese zweite Vorkultur wurde in einem 2-1-Erlenmeyerkolben angelegt und erneut bei  $39^{\circ}\text{C}$  21 h inkubiert, wobei während dieser Zeit eine OD  $> 12$  erreicht wurde. Für die Endstufe wurde der Inhalt des Kolbens keimfrei in den Rührkesselreaktor (Fermenter) überführt, was ungefähr 5 Gew.-% Impfkulturkonzentration ergab. Gefrorene Bakterienstämme wurden durch Züchten von Bakterien in VY-Medium bis zur späten exponentiellen Stufe ( $\text{OD}_{600} = 0,8 - 1,0$ ), Zugabe von steriles Glycerol auf eine Endkonzentration von 20% und dann Einfrieren von 1-ml-Proben auf Trockeneis und Lagern der gefrorenen Bakterien bei  $-80^{\circ}\text{C}$  hergestellt.

**[0035]** Während der Fermentation wurde durch automatische Zugabe von 27%iger Ammoniumhydroxidlösung und 3M HCl ein pH von 6,8 konstant in dem Reaktor gehalten. Die Fermentationstemperatur betrug  $39^{\circ}\text{C}$ . Die Mindestkonzentration von 15% gelöstem Sauerstoff ( $\text{pO}_2$ ) wurde durch automatische Kaskadenbildung des Rührers (im Bereich von 400 U/min bis 1000 U/min) und des Luftstroms bei Niveaus von mehr als 1 vvm erreicht. Entschäumer (Basildon) wurde manuell nach Bedarf zugegeben.

**[0036]** Die Fermentationen können Batch-Verfahren sein, sind bevorzugt aber Kohlenhydratbeschränkte, Fed-Batch-Verfahren. Daher wurde dem Reaktor nach Verbrauch der anfänglichen Glucose eine definierte VF-Fermentations-Speiselösung (siehe oben) zugeführt, was für gewöhnlich nach 6 bis 8 Stunden Verfahrenszeit der Fall war. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine konstante Zugabe der Speiselösung mit einer Geschwindigkeit von 84 g/h initiiert.

Bestimmung von Panthenol, Pantothenat, Pantoat, Aminopropanol und THMP (2,3,4-Trihydroxy-3-methyl-pentan)

**[0037]** Die Menge an Panthenol, Pantothenat, Pantoat, Aminopropanol und THMP wurde durch  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie wie folgt bestimmt: 500  $\mu\text{l}$  Überstand wurden 500  $\mu\text{l}$  einer Standardlösung, die eine genau bekannte Menge an Maleinsäure (5,607 g/l) enthält, zugegeben. Nach der Lyophilisierung und erneuten Auflösung in 650  $\mu\text{l}$   $\text{D}_2\text{O}$  wurde das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bei 600 MHz bei 300 K auf einem Bruker Avance 600-Spektrometer gemessen. Die Relaxationsverzögerung wurde auf 30 Sekunden eingestellt, um eine vollständige Relaxation zwischen den Scans sicherzustellen. Es wurden insgesamt 16 Scans gemessen. Aus dem Verhältnis zwischen den Integralen aus den Methylresonanzen der in Frage stehenden Verbindung wurde die genaue Menge der vorliegenden Komponenten berechnet.

#### BEISPIEL 1

**[0038]** Dieses Beispiel beschreibt die Konstruktion des Pantothenat-überproduzierenden Stammes PA12.

**[0039]** Polymerasenkettreaktion (PCR) wurde zur Erzeugung einer Deletionsmutation in der Promotorregion des panBCD-Operons eines prototrophen B. subtilis-Stammes 1A747, worin eine 215 bp lange Nukleotidregion zwischen birA und panB durch die Chloramphenicol(cat-)Resistenzkassette aus *Staphylococcus aureus* (GeneBank M58515) ersetzt wurde, verwendet. Hierfür wurde die cat-Kassette zunächst zwischen die Nhel- und Clal-Stellen des pBR322-Plasmids (GeneBank J01749) entgegengesetzt zur transkriptionalen Richtung von panB eingeschoben. Dann wurden zwei PCR-Fragment-„arme“ erzeugt: 0,2  $\mu\text{l}$  einer 100-mM-Lösung von Primern panB/up2/for/R1 und panB/up2/rev/Clal oder den Primern panB/down2/for/Nhel und panB/down2/rev/Bam (Tabelle 1) wurden 0,1  $\mu\text{g}$  1 A747 Chromosomen-DNA in einem Reaktionsvolumen von

50 µl, enthaltend 1 µl 100 mM dNTPs, 5 µl 10X-Puffer und 0,75 µl PCR-Enzym (Taq und Tgo), zugegeben, wie vom Hersteller beschrieben (Expand High fidelity PCR System-Roche Applied Science). Die PCR-Reaktion wurde über 30 Zyklen unter Anwendung einer Annealingtemperatur von 58°C und einer Elongationszeit von 60 Sekunden durchgeführt. Die resultierenden Fragmente, F1 bzw. F2 genannt, wurden gereinigt und nacheinander jeweils zwischen die EcoRI- und Clal-Stellen (für F1) und die NheI- und BamHI-Stellen (für F2) von pBR322 eingeführt. Ligierte DNA wurde in E. coli-TOP10-Zellen (Invitrogen), selektiert auf Ampicillinresistenz bei einer Konzentration von 100 µg/ml, transformiert. Dies führte zu dem E. coli-Plasmid pPA5. Dann wurde die ΔpanB<sub>p</sub>::cat-Deletionskassette durch DNA-Transformation in das Chromosom von B. subtilis 1A747, selektiert auf Chloramphenicolresistenz (Cm<sup>r</sup>), auf TBAB-Agarplatten, enthaltend 5 µg/ml Chloramphenicol (Cm), unter Verwendung von Standardbedingungen eingeführt. Eine einzelne Cm<sup>r</sup>-Kolonie mit einer Deletion in der panB-Promotor-Region wurde isoliert und PA1 (ΔpanB<sub>p</sub>::cat) genannt. Wie erwartet, war PA1 auch ein Pantothenat-Auxotrophe (Pan), der Pantothenat zum Wachstum auf Minimalmedium benötigt. Die Deletionsmutation wurde durch diagnostische PCR unter Verwendung von panB/up2/for/R1- und panB/down2/rev/Bam-Primern (Tabelle 1) wieder unter Verwendung von Standardreaktionsbedingungen bestätigt.

Tabelle 1. Primer, die zur Erzeugung eines B. subtilis-Stammes, enthaltend eine ΔpanB<sub>p</sub>::cat-Deletionsmutation, verwendet werden.

Name	Nukleotidsequenz (5' > 3')	SEQ ID Nr.:
cat/for/NheI	ATGCGCTAGCCGAAATTGGATAAAAGTGGG	1
cat/rev/ClaI	ATGCATCGATAAGTACAGTCGGCATTATCTCATA	2
panB/up2/for/R1	ATGCGAATTGGGTATGGCATTCTCAAGAAGG	3
panB/down2/rev/Bam	ATGCGGATCCGCCGTCAAGCACTGTCTGG	4
panB/up2/rev/ClaI	ATGCATCGATGGAAGTATACCAAAATCAACGG	5
panB/down2/for/NheI	ATGCGCTAGCATGAAAACAAAAGTGGATTTTC	6

**[0040]** Der nächste Schritt war die Einführung eines starken konstitutiven Promoters upstream des panB-Gens. Solche Promotoren sind in der Literatur beschrieben, einschließlich derer, die aus dem SPOT-Bakteriophagen von B. subtilis stammen, P<sub>15</sub> und P<sub>26</sub> (Lee et. al., 1980). Long-Flanking-Homology-Polymerasekettenreaktion (LFH-PCR) (Wach, 1996) wurde zur Erzeugung von DNA-Fragmenten, die P<sub>15</sub> upstream der Ribosomenbindungsstelle (RBS) von panB enthalten, verwendet. Hierfür wurden zunächst zwei PCR-Fragment-„arme“ erzeugt: 0,2 µl einer 100-mM-Lösung von Primer P1panBCD und P2panBCD oder den Primer P3panBCD und P4panBCD (Tabelle 2) wurden zu 0,1 µg 1A747 Chromosomen-DNA in einem Reaktionsvolumen von 50 µl, enthaltend 1 µl 40 mM dNTPs, 5 µl 10X-Puffer und 0,75 µl PCR-Enzym (Taq und Tgo), zugegeben, wie vom Hersteller (Expand High fidelity PCR System-Roche Applied Science) beschrieben. Die PCR-Reaktion wurde über 30 Zyklen unter Anwendung einer Annealingtemperatur von 55,7°C und einer Elongationszeit von 45 Sekunden durchgeführt. Die resultierenden Fragmente, F3 bzw. F4 genannt, wurden gereinigt und als Primer in einer zweiten PCR-Runde verwendet. F3- und F4-Fragmente wurden 50fach verdünnt, und 1 µl von jedem wurde zu 0,1 µg des linearisierten Plasmids pXI23roDTD-SPO1-15 (enthaltend den P<sub>15</sub>-Promotor) in einem Reaktionsvolumen von 50 µl zugegeben. In den ersten 10 Zyklen wurden eine Annealingtemperatur von 63°C und eine Elongationszeit von 6 Minuten verwendet. In den nächsten 20 Zyklen wurde die Elongationszeit um 20 Sekunden nach jedem Zyklus ausgedehnt. Die resultierenden Produkte wurden dann in einer dritten PCR-Runde als eine Matrize verwendet. Die PCR-Produkte wurden 50fach verdünnt, und 1 µl wurde mit 0,2 µl einer 100-mM-Lösung von Primer P1panBCD und P4panBCD in einem Reaktionsvolumen von 50 µl, enthaltend dNTPs, Puffer und Enzyme, wie oben beschrieben, vereinigt. Die PCR-Reaktionsparameter waren mit denen, die in der zweiten PCR-Runde verwendet wurden, identisch. Die fertigen PCR-Fragmente wurden als nächstens durch DNA-Transformation in den panB-Promotor-deletierten Stamm PA1, selektiert auf Pantothenatprototrophie (Pan<sup>+</sup>), auf Minimalmedium-Agarplatten unter Verwendung von Standardbedingungen transformiert. Diese Pan<sup>+</sup>-Kolonien waren auch Chloramphenicol-sensitiv (Cm<sup>s</sup>), was die Insertion der Promotorkassette bestätigte. Eine einzelne Pan<sup>+</sup>-Cm<sup>s</sup>-Kolonie, enthaltend ein panBCD-Operon, exprimiert aus dem P<sub>15</sub>-Promotor, wurde isoliert und PA12 (P<sub>15</sub>panBCD) genannt. Die Gegenwart des P<sub>15</sub>-Promotors upstream des panB-Gens wurde durch diagnostische PCR unter Verwendung von P15seq- und P4panBCD-Primern (Tabelle 2) wieder unter Verwendung von Standardreaktionsbedingungen bestätigt.

Tabelle 2. Primer, die zur Erzeugung eines *B. subtilis*-Stammes, enthaltend eine  $P_{15}$ panBCD-Expressionskasse, verwendet werden.

Name	Nukleotidsequenz (5' > 3')	SEQ ID Nr.:
P1panBCD	CCTTATTGAATTATTTCTCAGGCCG	7
P2panBCD	GGACTGATCTCCAAGCGATGGATGGAAGTATAACAAAATCAACGGC	8
P3panBCD	TCGAGAATTAAAGGAGGGTTCATATGAAAACAAAATGGATTTCT	9
P4panBCD	CGGATATGCTTCAAAATCTTCATTAGG	10
P15seq	CTACTATTCAACACAGCTATCTGC	11

## BEISPIEL 2

[0041] Dieses Beispiel beschreibt die Konstruktion des Pantothenat-überproduzierenden Stammes PA49.

[0042] Zur Konstruktion eines Stammes, der auch einen starken konstitutiven Promotor upstream des panE-Gens (*ylbQ*) enthielt, wurde zunächst eine Deletionsmutation konstruiert. Die Untersuchung des panE-Gens deckte zwei potentielle Startstellen auf: Startstelle 1 (5'-AAATTGGGTG-3'(RBS)-7 nt-ATG), die eine BspHI-Stelle überlappt und sich 33 bp upstream von Startstelle 2 (5'-GGAGG-3'(RBS)-5 nt-TTG) befindet, die eine BsaXI-Stelle überlappt. Folglich wurde eine 219 bp-Deletion der panE/ylbQ-Promotorregion durch LFH-PCR unter Verwendung eines *S. aureus*-Erythromyzinresistenz-(Em<sup>r</sup>)-Gens konstruiert (GenBank V01278). Hierfür wurden zunächst zwei PCR-Fragment-„arme“ erzeugt: 0,2 µl einer 100-mM-Lösung von Primer P1panE und P2panE/Er oder den Primer P3panE/Er/2 und P4panE (Tabelle 3) wurden zu 0,1 µg 1A747 chromosomaler DNA in einem Reaktionsvolumen von 50 µl, enthaltend 1 X140 mM dNTPs, 5 µl 10X-Puffer und 0,75 µl PCR-Enzym (Taq und Tgo), zugegeben, wie vom Hersteller (Expand High fidelity PCR System-Roche Applied Science) beschrieben. Die PCR-Reaktion wurde über 30 Zyklen unter Verwendung einer Annealingtemperatur von 55,7°C und einer Elongationszeit von 45 Sekunden durchgeführt. Die resultierenden Fragmente, F1 bzw. F2 genannt, wurden gereinigt und als Primer in einer zweiten PCR-Runde verwendet. Die F1- und F2-Fragmente wurden 50fach verdünnt, und 1 µl von jedem wurde zu 0,1 µg des linearisierten Plasmids pDG646 (enthaltend die erm-Kassette; Guerout-Fleury et. al., 1995) in einem Reaktionsvolumen von 50 µl zugegeben. In den ersten 10 Zyklen wurde eine Annealingtemperatur von 63°C und eine Elongationszeit von 6 Minuten verwendet. In den folgenden 20 Zyklen wurde die Elongationszeit um 20 Sekunden nach jedem Zyklus ausgedehnt. Die resultierenden Produkte wurden dann in einer dritten PCR-Runde als eine Matrize verwendet. Die PCR-Produkte wurden 50fach verdünnt, und 1 µl wurde mit 0,2 µl einer 100-mM-Lösung von Primer P1panE und P4panE in einem Reaktionsvolumen von 50 µl, enthaltend dNTPs, Puffer und Enzym, wie oben beschrieben, vereinigt. Die PCR-Reaktionsparameter waren mit denen, die in der zweiten PCR-Runde verwendet wurden, identisch. Die fertigen PCR-Fragmente wurden als nächstes in PA4 (Trp<sup>+</sup>-Kolonien, erhalten aus *B. subtilis* CU550 trpC2 ilvC4 leu-124 durch Transformation mit 1A747 chromosomaler DNA) transformiert, was zu Em<sup>r</sup>-Kolonien führte, die Pantothenat-Auxotrophen waren. Dieser Stamm wurde PA5 ( $\Delta$ panE<sub>p</sub>::erm ilvC leuC) genannt. Diagnostische PCR wurde zur Bestätigung der Struktur der Deletion verwendet. Anschließend wurde die panB-Promotordeletion durch Transformation in PA5 von PA1 chromosomaler DNA bei nicht kongressionaler (non-congressional) Konzentration eingeführt, wodurch PA6 (ilvC leuC  $\Delta$ panB<sub>p</sub>::cat  $\Delta$ panE<sub>p</sub>::erm) erzeugt wurde.

Tabelle 3. Primer, die zur Erzeugung eines *B. subtilis*-Stammes, enthaltend eine  $\Delta$ panE<sub>p</sub>::erm-Deletionsmutation, verwendet werden.

Name	Nukleotidsequenz (5' > 3')	SEQ ID Nr.:
P1panE	GGCAGCCTGTGGTTTCAGGTGG	12
P2panE/Er	ATTATGTCTTTGCGCAGTCGGCCGTCTGCTTATCAACTATAAAA CGC	13
P3panE/Er/2	CATTCAATTGAGGGTGCCAGGCCTATTATTCGTCACTTTATC ACG	14
P4panE	CCAGTCTTCGCGCCACATGTCC	15

[0043] Der nächste Schritt war die gleichzeitige Einführung starker konstitutiver  $P_{15}$ -Promotoren upstream so-

wohl von panB als auch panE. LFH-PCR wurde erneut zur Erzeugung von DNA-Fragmenten, enthaltend P<sub>15</sub> upstream des offenen Leserasters von panB und enthaltend P<sub>15</sub> upstream des offenen Leserasters von panE, verwendet. Hierfür wurden zwei PCR-Fragment-„arme“ für panB und panE unter Verwendung der Primer P1 panB und P2panB/P15 (F1) und der Primer P3panB/P15 und P4panB (F2) (Tabellen 1 und 2, P<sub>15</sub>panB-Konstruktion), und P1panE und P2panE/P15 (F1) und P3panE/P15 und P4panE (F2) (Tabellen 3 und 4, P<sub>15</sub>panE-Konstruktion), unter Verwendung desselben PCR-Protokolls, das zur Konstruktion von PAI2 verwendet wurde (siehe oben) erzeugt.

Tabelle 4. Primer, die zur Erzeugung eines *B. subtilis*-Stammes, enthaltend eine P<sub>15</sub>panE-Expressionskassette, verwendet werden.

Name	Nukleotidsequenz (5' > 3')	SEQ ID Nr.:
P2panE/P15	GGACTGATCTCCAAGCGATGGGAATTTTTAAATAAGCG TTTACAATAT	16
P3panE/P15	TCGAGAATTAAAGGAGGGTTCATATGAAAATTGGAATTA TCGGCGGAG	17

**[0044]** Die fertigen P<sub>15</sub>panB- und P<sub>15</sub>panE-PCR-Fragmente wurden dann durch DNA-Transformation unter Verwendung von Standardbedingungen zusammen in den panB- und panE-Promotor-deletierten Stamm PA6 (ilvC leuC ΔpanB<sub>p</sub>::cat ΔpanE<sub>E</sub>::erm), selektiert auf Pantothenatprototrophie (Pan<sup>+</sup>), auf Minimalmedium-Agarplatten transformiert. Die gewonnenen Pan<sup>+</sup>-Kolonien waren ebenso Cm<sup>s</sup>- und Erythromyzin-sensitiv (Em<sup>s</sup>), was die Insertion der Promotorkassetten bestätigte. Eine einzelne Pan<sup>+</sup>-Cm<sup>s</sup>-Em<sup>s</sup>-Kolonie, enthaltend sowohl ein panBCD-Operon als auch ein panE-Gen, exprimiert aus dem P<sub>15</sub>-Promotor, wurde isoliert und PA32 genannt. Die Gegenwart des P<sub>15</sub>-Promotors upstream des panB-Gens wurde durch diagnostische PCR unter Verwendung von P15seq- und P4panB-Primern (Tabellen 1 und 2) erneut unter Anwendung von Standardreaktionsbedingungen bestätigt. Eine identische Kontrolle wurde an dem panE-Gen unter Verwendung von P15seq- und P4panB-Primern durchgeführt (Tabellen 3 und 4). Die anschließende Sequenzierung des P<sub>15</sub>-Promotors vor panE deckte jedoch eine teilweise Deletion des P<sub>15</sub>-Promotors auf.

**[0045]** Zum Austausch des teilweise deletierten P<sub>15</sub>panE-Gens mit der richtigen Konstruktion wurde die ΔpanE<sub>p</sub>::erm-Mutation durch DNA-Transformation unter Verwendung chromosomaler DNA aus PA5 (ΔpanE<sub>p</sub>::erm ilvC leuC) und Selektieren auf Erythromyzinresistenz erneut in PA32 eingeführt. Dies führte zu dem Stamm PA41 (P<sub>15</sub>panBCD ApanEp::erm ilvC leuC). Die P<sub>15</sub>panE-DNA-Fragmente, erzeugt durch LFH-PCR wie oben beschrieben, wurden dann in PA41, selektiert auf Pan<sup>+</sup>-Prototrophie, transformiert. Dies führte zu dem Stamm PA43 (ilvC leuC P<sub>15</sub>panBCD P<sub>15</sub>panE). Dieser auxotrophe Ilv<sup>+</sup>Leu<sup>+</sup>-Stamm wurde dann unter Verwendung eines PBS1-Phagenlysats, hergestellt auf Wildtyp-*B. subtilis* 1A747, unter Verwendung von Standardprozeduren in Ilv<sup>+</sup>Leu<sup>+</sup>-Prototrophie transduziert. Dies führte zu dem Stamm PA49 (P<sub>15</sub>panBCD P<sub>15</sub>panE).

### BEISPIEL 3

**[0046]** Dieses Beispiel beschreibt die Konstruktion des Stammes PA112, ein Derivat von PA49, das eine Deletion von panC enthält.

**[0047]** Long-Flanking-Homology-Polymerasekettenreaktion (LFH-PCR) wurde zur Erzeugung einer Deletionsmutation in der kodierenden Region despanC-offenen Leserasters des panBCD-Operons verwendet, worin eine 487 bp lange Nukleotidregion von panC durch die Chloramphenicol-(cat)-Resistenzkassette aus *Staphylococcus aureus* (GenBank M58515) ersetzt wurde. Hierfür wurden zunächst zwei PCR-Fragment-„arme“ erzeugt: 0,2 µl einer 100-µM-Lösung der Primer P1panC und P2panC-cat oder der Primer P3panC und P4panC-cat (Tabelle 5) wurden zu 0,1 µg 1A747 chromosomaler DNA in einem Reaktionsvolumen von 50 µl, enthaltend 1 µl 40 mM dNTPs, 5 µl 10X-Puffer und 0,75 µl PCR-Enzym (Taq und Tgo), zugegeben, wie vom Hersteller (Expand High fidelity PCR System-Roche Applied Science) beschrieben. Die PCR-Reaktion wurde über 30 Zyklen unter Anwendung einer Annealingtemperatur von 55,7°C und einer Elongationszeit von 45 Sekunden durchgeführt. Die resultierenden Fragmente, F1 bzw. F2 genannt, wurden gereinigt und als Primer in einer zweiten PCR-Runde verwendet. Die F1- und F2-Fragmente wurden 50fach verdünnt, und 1 µl von jedem wurde zu 0,1 µg des linearisierten Plasmids pPA4 (enthaltend die cat-Kassette) in einem Reaktionsvolumen von 50 µl zugegeben. In den ersten 10 Zyklen wurden eine Annealingtemperatur von 63°C und eine Elongationszeit von 3 Minuten verwendet. In den nächsten 20 Zyklen wurde die Elongationszeit um 20 Sekunden nach

jedem Zyklus ausgedehnt. Die resultierenden Produkte wurden dann in einer dritten PCR-Runde als eine Matrize verwendet. Die PCR-Produkte wurden 50fach verdünnt, und 1 µl wurde mit 0,2 µl einer 100-µM-Lösung der Primer P1panC und P4panC in einem Reaktionsvolumen von 50 µl, enthaltend dNTPs, Puffer und Enzym, wie oben beschrieben, vereinigt. Die PCR-Reaktionsparameter waren mit denen identisch, die in der zweiten PCR-Runde verwendet wurden. Die fertigen PCR-Fragmente wurden als nächstes in den Pantothenat-überexprimierenden Stamm PA49, selektiert auf Chloramphenicolresistenz auf TBAB-Medium (Cm'), transformiert. Eine einzelne Cm' Kolonie, deletiert für panC, wurde isoliert und PA112 ( $P_{wt}panB\Delta C::catD$ ) genannt. Die Gegenwart der cat-Kassette wurde durch diagnostische PCR unter Verwendung von P1panC und P4panC erneut unter Verwendung von Standardreaktionsbedingungen bestätigt. Phenotypisch gesehen, konnte PA112 auf Minimalmedium (MM), angereichert mit entweder 1 mM Pantoat oder 1 mM Pantoat plus 1 mM β-Alanin, nicht wachsen, wuchs aber normal auf MM mit 1 mM Pantothenat. In Schüttelkolbenkulturen wuchs PA112 schlecht mit entweder 1 µM oder 10 µM Pantothenat, aber normal, wenn die Pantothenat-Ergänzung auf 100 µM oder 1 mM erhöht wurde.

Tabelle 5. Primer, die zur Erzeugung einer ΔpanC::cat-Deletionsmutation verwendet werden

Name	Nukleotidsequenz (5' > 3')	SEQ ID Nr.:
P1panC	<u>GAGACAGATTACTGATATTCACAGC</u>	18
P2panC-cat	<u>CCCACTTTATCCAATTTCGAACACACGTCTGTGCGTCTTC</u>	19
P3panC-cat	<u>TAACCTGCCCGTTAGTTGAACGAGAAATGGAGAGAATAT</u> <u>AATATG</u>	20
P4panC	<u>TCAGAACAGCCACTTCCGGC</u>	21

Unterstrichene Sequenzen waren homolog mit derpanC-Region

#### BEISPIEL 4

**[0048]** Dieses Beispiel beschreibt die Konstruktion des Stammes PA121, ein Derivat von PA49, das eine Deletion von panCD enthält.

**[0049]** Long-Flanking-Homology-Polymerasekettenreaktion (LFH-PCR) wurde zur Erzeugung einer Deletionsmutation, umfassend die kodierenden Regionen der panC- und panD-offenen Leseraster des panBCD-Operons, verwendet, worin eine 874 bp lange Nukleotidregion von panC und panD durch die Chloramphenicol-(cat-)Resistenzkassette aus *Staphylococcus aureus* (GenBank M58515) ersetzt wurde. Hierfür wurden zunächst zwei PCR-Fragment-„arme“ erzeugt: 0,2 µl einer 100-µM-Lösung der Primer P1panC und P2panC-cat oder der Primer P3panD-cat und P4panD (Tabelle 6) wurden zu 0,1 µg 1A747 chromosomaler DNA in einem Reaktionsvolumen von 50 µl, enthaltend 1 µl 40 mM dNTPs, 5 µl 10X-Puffer und 0,75 µl PCR-Enzym (Taq und Tgo), zugegeben, wie vom Hersteller (Expand High fidelity PCR System-Roche Applied Science) beschrieben. Die PCR-Reaktion wurde über 30 Zyklen unter Anwendung einer Annealingtemperatur von 55,7°C und einer Elongationszeit von 45 Sekunden durchgeführt. Die resultierenden Fragmente, F1' bzw. F2' genannt, wurden gereinigt und als Primer in einer zweiten PCR-Runde verwendet. Die F1'- und F2'-Fragmente wurden 50fach verdünnt, und 1 µl von jedem wurde zu 0,1 µg des linearisierten Plasmids pPA4 (enthaltend die cat-Kassette) in einem Reaktionsvolumen von 50 µl zugegeben. In den ersten 10 Zyklen wurden eine Annealingtemperatur von 63°C und eine Elongationszeit von 5 Minuten verwendet. In den nächsten 20 Zyklen wurde die Elongationszeit um 20 Sekunden nach jedem Zyklus ausgedehnt. Die resultierenden Produkte wurden dann in einer dritten PCR-Runde als eine Matrize verwendet. Die PCR-Produkte wurden 50fach verdünnt, und 1 µl wurde mit 0,2 µl einer 100-µM-Lösung der Primer P1panC und P4panD in einem Reaktionsvolumen von 50 µl, enthaltend dNTPs, Puffer und Enzym, wie oben beschrieben, vereinigt. Die PCR-Reaktionsparameter waren mit denen identisch, die in der zweiten PCR-Runde verwendet wurden. Die fertigen PCR-Fragmente wurden als nächstes in den Pantothenat-überexprimierenden Stamm PA49, selektiert auf Chloramphenicolresistenz auf TBAB-Medium (Cm'), transformiert. Eine einzelne Cm'-Kolonie, deletiert für panCD, wurde isoliert und PA121 ( $P_{wt}panB\Delta CD::cat$ ) genannt. Die Gegenart der cat-Kassette wurde durch diagnostische PCR unter Verwendung von P1panC und P4panD erneut unter Verwendung von Standardreaktionsbedingungen bestätigt. Wie Stamm PA112 konnte PA121 phenotypisch gesehen auf Minimalmedium (MM), angereichert mit entweder 1 mM Pantoat oder 1 mM Pantoat plus 1 mM β-Alanin, nicht wachsen, wuchs aber normal auf MM mit 1 mM Pantothenat. In Schüttelkolbenkulturen wuchs PA121 schlecht mit entweder 1 µM oder 10 µM Panto-

thenat, aber normal, wenn die Pantothenat-Ergänzung auf 100 µM oder 1 mM erhöht wurde.

Tabelle 6. Primer, die zur Erzeugung einer ΔpanCD::cat-Deletionsmutation verwendet werden

Name	Nukleotidsequenz (5' > 3')	SEQ ID Nr.:
P1panC	<u>GAGACAGATTACTGATATTCACAGC</u>	18
P2panC-cat	CCCACTTATCCAATTTCGAACACGTCTGTGCGTCTTC	19
P3panD-cat	TAACCTGCCCGTTAGTTGA <u>ACGAACCAGCCGTACAATTTG</u>	22
P4panD	<u>GATTAGAGATTCCAGTAAGCTGCTC</u>	23

Unterstrichene Sequenzen waren homolog mit der panCD-Region

#### BEISPIEL 5

**[0050]** Dieses Beispiel beschreibt die Konstruktion des Pantothenat-überproduzierenden Stammes PA73.

**[0051]** LFH-PCR wurde zur Erzeugung von DNA-Fragmenten, enthaltend einen P26-Promotor upstream von ilvD, verwendet. Zunächst wurden zwei PCR-Fragment-„arme“ unter Verwendung der Primer P1/ilvD/for und P2/ilvD/f/26 für den F1-Arm und der Primer P3/ilvD/r/26 und P4/ilvD/rev (F2-Arm) (Tabelle 7) amplifiziert. Die Matrize war chromosomal DNA von 1A747. Die resultierenden F1- und F2-Arme wurden als Primer in einer zweiten PCR-Runde mit dem linearisierten Plasmid pUC18SP01-26 (enthaltend den P<sub>26</sub>-Promotor) verwendet. Das resultierende F1-P<sub>26</sub>-F2-LFH-PCR-Produkt wurde mit den Primern P1/ilvD/for und P4/ilvD/rev (Tabelle 7) in einer dritten PCR-Runde amplifiziert. Das F1-P<sub>26</sub>-F2-LFH-PCR-Fragment, enthaltend P<sub>26</sub>ilvD, wurde in den ilvD-Promotor-deletierten Stamm PA24 (ΔilvD::spec) transformiert, was zu PA27 (P<sub>26</sub>ilvD) führte. P<sub>26</sub>ilvD wurde durch Transduktion mit PBS1-Lysat aus PA27 in den ilvD-Promotor-deletierten Stamm PA60 (P<sub>15</sub>panBCD P<sub>15</sub>panE ΔilvD::spec) eingeführt. Die prototrophen und Spectinomyzin-sensitiven (Specs) ilvD-Kolonien wurden auf Minimal-Agarplatten selektiert. Der resultierende Stamm PA62 (P<sub>15</sub>panBCD P<sub>15</sub>panE P<sub>26</sub>ilvDG<sup>320D</sup>) trug eine einzelne Punktmutation in der ilvD-kodierenden Region, die eine Gly-zu-Asp-Aminosäureänderung in Rest 320 verursachte. Die ilvD-Kodierungssequenz wurde dann zum Wildtyp rekonstruiert, indem zunächst ein internes Segment des ilvD-Gens, das diese Mutation umfaßt, unter Verwendung von LFH-PCR entfernt wurde. Zwei PCR-Fragment-„arme“ wurden mit den Primern P1c/ilvD/for und P2c/ilvD/cat für den F1-Arm und den Primern P3c/ilvD/cat und P4c/ilvD/rev für den F2-Arm amplifiziert (Tabelle 7). Die Matrix-DNA war chromosomal DNA von 1A747. Die resultierenden F1- und F2-Arme wurden als Primer in einer zweiten PCR-Runde mit dem linearisierten Plasmid pTH5 (enthaltend die cat-Kassette; GenBank M58515) verwendet. Das F1-cat-F2-LFH-PCR-Fragment wurde in PA26 transformiert und der Cm<sup>r</sup>- und ilvD<sup>r</sup>-Auxotrophenstamm PA64 (P<sub>15</sub>panBCD P<sub>15</sub>panE P<sub>26</sub>ΔilvD::cat) wurde selektiert. Diagnostische PCR wurde zur Bestätigung der Struktur der Deletion verwendet. Der Stamm PA64 wurde dann unter Verwendung chromosomal DNA des Wildtyp-Stammes 1A747 prototroph gemacht. In dem resultierenden Stamm PA73 (P<sub>15</sub>panBCD P<sub>15</sub>panE P<sub>26</sub>ilvD) wurde die Gegenwart des P<sub>26</sub>-Promoters upstream von ilvD und die Abwesenheit des cat-Gens durch diagnostische PCR unter Verwendung der P26seq- und P4/ilvD/rev-Primer bestätigt (Tabelle 7).

Tabelle 7. Primer, die zur Erzeugung einer ΔilvD::spec-Deletionsmutation und P26-getriebenen Überexpression von ilvD verwendet werden

Name	Nukleotidsequenz (5' > 3')	SEQ ID Nr.:
P1/ilvD/for	<u>AAACCTGAGCAAGCAGAAGGCAGCA</u>	24
P2/ilvD/r/sp	ACATGTATTACGAACGAAAATCGAC <u>ATGATCTGCACCTTTT</u> <u>TTATCTTTATTG</u>	25
P3/ilvD/f/sp	ATTTTAGAAAACAATAAACCC <u>TGCAATGGCAGAATTACGCA</u> <u>GTAATATGAT</u>	26
P4/ilvD/rev	<u>AAATGAAGCGCTCCTCTTCCTTCG</u>	27
P1c/ilvD/for	<u>ATGGCAGAATTACGCAGTAATATGAT</u>	28
P2c/ilvD/cat	CCCACTTTATCCAATTTC <u>CGCGTCGGAATGTTGATGCGCATT</u> <u>G</u>	29
P3c/ilvD/cat	TAACCTGCCCGTTAGTTGA <u>ACGGCGTACAGAATGGGATTAC</u> <u>AAG</u>	30
P4c/ilvD/rev	<u>GCACCTGTACAAGTTAGAATAACG</u>	31
P2/ilvD/f/26	<u>GGACTGATCTCCAAGCGATGGCATGATCTGCACCTTTTAT</u> <u>CTTTATTG</u>	32
P3/ilvD/r/26	TCGAGAATTAAAGGAGGGTT <u>CATATGGCAGAATTACGCA</u> <u>GAT</u>	33
P26seq	CTACTATTCAACACAGCTATCTGC	34

unterstrichene Sequenzen waren homolog mit der ilvD-Region

#### BEISPIEL 6

**[0052]** Dieses Beispiel beschreibt die Konstruktion von PA207, ein Derivat von PA12, das eine Deletion des panD-Gens enthält.

**[0053]** Ein Stamm mit einem  $P_{15}\text{panBC}\Delta\text{panD}:\text{spec}$ -Operon wurde in zwei Schritten konstruiert.

**[0054]** Zunächst wurde die panD-Deletionskassette in den Stamm PA1, der eine Deletion der panB-Leaderregion enthielt, transformiert. Long-Flanking-Homology-Polymerasekettenreaktion (LFH-PCR) wurde zur Erzeugung einer Deletionsmutation in der kodierenden Region des panD-offenen Leserasters des panBCD-Operons verwendet, worin die Nukleotidregion von panD durch die Adenyltransferasekassette aus *Staphylococcus aureus* (Zugriffszahl Xo3216), die Resistenz gegen Spectinomycin verleiht, ersetzt wurde. Hierfür wurden zunächst zwei PCR-Fragment-„arme“ erzeugt: 0,2 µl einer 100-µM-Lösung der Primer P1panD und P2panD-spec oder der Primer P3panD-spec und P4panDb (Tabelle 8) wurden zu 0,1 µg 1A747 chromosomaler DNA in einem Reaktionsvolumen von 50 µl, enthaltend 1 µl 40 mM dNTPs, 5 µl 10X-Puffer und 0,75 µl PCR-Enzym (Taq und Tgo), zugegeben, wie vom Hersteller (Expand High fidelity PCR System-Roche Applied Science) beschrieben. Die PCR-Reaktion wurde über 30 Zyklen unter Verwendung einer Annealingtemperatur von 55,7°C und einer Elongationszeit von 45 Sekunden durchgeführt. Die resultierenden Fragmente, F1 bzw. F2 genannt, wurden gereinigt und als Primer in einer zweiten PCR-Runde verwendet. Die F1- und F2-Fragmente wurden 50fach verdünnt, und 1 µl von jedem wurden zu 0,1 µg des linearisierten Plasmids pDG1726 (enthaltend die spec-Kassette) in einem Reaktionsvolumen von 50 µl zugegeben. In den ersten 10 Zyklen wurden eine Annealingtemperatur von 63°C und eine Elongationszeit von 3 Minuten verwendet. In den nächsten 20 Zyklen wurde die Elongationszeit um 20 Sekunden nach jedem Zyklus ausgedehnt. Die resultierenden Produkte wurden dann in einer dritten PCR-Runde als eine Matrize verwendet. Die PCR-Produkte wurden 50fach verdünnt, und 1 µl wurde mit 0,2 µl einer 100-µM-Lösung der Primer P1panD und P4panD in einem Reaktionsvolumen von 50 µl, enthaltend dNTPs, Puffer und Enzym, wie oben beschrieben, vereinigt. Die PCR-Reaktionsparameter waren mit denen identisch, die in der zweiten PCR-Runde verwendet wurden. Die fertigen PCR-Fragmente wurden dann in den Stamm PA1, selektiert auf Spectinomycinresistenz auf TBAB-Medium (Spr), transformiert. Eine einzelne Spr-Kolonie, deletiert für panD, wurde isoliert und PA203 genannt. Ein DNA-Fragment, enthal-

tend den P<sub>15</sub>-Promotor (siehe Konstruktion von PA12) wurde dann in den Stamm PA203 transformiert, um so das genetisch hergestellte P<sub>15</sub>panBCΔD-Operon zu rekonstruieren. Zellen, die dieses Operon enthalten, wurden durch Aufarbeitung für Pan<sup>+</sup>-Prototrophie und Verlust an Chloramphenicolresistenz selektiert. Dies führte zu dem Stamm PA207. Die phenotypische Analyse zeigte, daß PA207 ein β-Alanin-Bradytroph war. Die Gegenwart der spec-Kassette wurde durch diagnostische PCR unter Verwendung von P1panD und P4panDb erneut unter Verwendung von Standardreaktionsbedingungen bestätigt.

Tabelle 8. Primer, die zur Erzeugung einer dpanD::spec-Deletionsmutation verwendet wurden

Name	Nukleotidsequenz (5' > 3')	SEQ ID Nr.:
P1panD	<u>CCGATGCCTGGAGGAGCTTC</u>	35
P2panD-spec	<u>ACATGTATTCACGAACGAAAATCGAAAGAAAAGCC</u> <u>CCCTTTATCGGGG</u>	36
P3panD-spec	<u>ATTTTAGAAAACAATAAACCCTTGCAATTATATTTC</u> <u>TCTCCATTCTCGAATATC</u>	37
P4panDb	<u>CGCGCATTGATGAAACCATCGAAAC</u>	38

#### BEISPIEL 7

**[0055]** Dieses Beispiel demonstriert die Herstellung von Panthenol durch Einspeisung von 3-Aminopropanol in die Stämme PA49, PA73, PA112, PA121 und PA207.

**[0056]** Über-Nacht-Kulturen von PA112, PA121 und PA207 wurden bei 37°C gezüchtet und 1:100 in 200 ml frisch hergestelltem SMG-Medium verdünnt. Drei 40-ml-Aliquote jeder Kultur wurden dann in 250-ml-Kolben, enthaltend Styroformstopper, überführt. Eine HCl-neutralisierte Lösung von 3-Aminopropanol (pH 7,2) wurde auf eine Endkonzentration von 40 g/l in jeden Kolben gegeben. Es wurde bei 37°C für 72 Stunden weiter gezüchtet, wobei zu diesem Zeitpunkt die Zellen durch Zentrifugation entfernt und Überstände steril filtriert wurden. Als Kontrollen wurden Pantoat und 3-Aminopropanol in das Kulturmödium ohne Zellen gegeben und 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Panthenol-, Pantoat- und Pantothenat-Gehalte wurden durch NMR gemessen, und die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefaßt. Die Herstellung von Panthenol wurde eindeutig in den Stämmen PA49, PA73 und PA207 detektiert. Die Stämme PA112 und PA121, die eine Deletion von panC enthielten, produzierten kein Panthenol. Es wurde keine spontane Bildung von Panthenol detektiert, wenn Pantoat und 3-Aminopropanol 72 Stunden in Kulturmödium (keine Zellen) inkubiert wurden. Diese Ergebnisse zeigen, daß das PanC-Enzym, das normalerweise unter Bildung von Pantothenat Pantoat und β-Alanin koppelt, unter Bildung von Panthenol auch Pantoat und 3-Aminopropanol koppeln kann. Offensichtlich können die enzymatischen Eigenschaften von PanC zur Katalyse der Umwandlung von Pantoat und 3-Aminopropanol zu Panthenol unter Verwendung von Verfahren (z. B. PCR-Mutagenese, Proteinentwicklung), die einem Fachmann allgemein bekannt sind, enorm verbessert werden.

Tabelle 9. Herstellung von Panthenol in verschiedenen Pantothenat-Herstellungsstämmen, die in Gegenwart von 40 g/Liter Aminopropanol heranwuchsen.

Stamm	Genotyp	3-Aminopropanol (g/Liter) <sup>a</sup>	Pantothenat (g/Liter) <sup>a</sup>	Pantoat (g/Liter) <sup>a</sup>	Panthenol (g/Liter) <sup>a</sup>
PA49	P <sub>15</sub> panBCD	25,1	4,9	0,2	0,04
	P <sub>15</sub> panE				
PA73	P <sub>15</sub> panBCD	25,0	5,4	0,2	0,06
	P <sub>15</sub> panE				
	P <sub>26</sub> ilvD				
PA112 <sup>b</sup>	P <sub>15</sub> panB[ΔCJD]	24,5	0,6	0,3	0,00
	P <sub>15</sub> panE				
PA121 <sup>b</sup>	P <sub>15</sub> panB[ΔCD]	23,0	0,6	0,4	0,00
	P <sub>15</sub> panE				
PA207	P <sub>15</sub> panBCApanD::spec	23,5	0,1	0,3	0,05
	P <sub>15</sub> panE				

<sup>a</sup> Durchschnitt von drei Proben<sup>b</sup> 1 mM Pantothenat, zugegeben zu den Kulturen, da PA112 und PA121 Pantothenatauxotrophen sind.

## BEISPIEL 8

**[0057]** Dieses Beispiel demonstriert die Herstellung von Panthenol durch Einspeisung von 3-Aminopropanol und Pantoat in den Stamm PA207 in einem Rührkesselreaktor unter Verwendung des Fed-Batch-Verfahrensmodus.

**[0058]** Stamm PA207 wurde in Standard-Glucose-beschränkter Fed-Batch-Fermentation 71 Stunden gezüchtet. Nach anfänglich ~6 h der Batch-Phase wurde die Fed-Batch-Phase unter Verwendung einer 80%igen Glucosespeisung im Bereich von 84 bis 95 g/h gestartet. Nach 25 h Fermentationszeit wurde eine 98%ige Lösung von 3-Aminopropanol mit einer Durchschnittsgeschwindigkeit von 14 g/h über 22 h zugeführt. Zehn Stunden nach Beginn der 3-Aminopropanoleinspeisung wurde eine 41,5%ige Pantoatlösung mit einer Durchschnittsgeschwindigkeit von 26 g/h für ungefähr 16 h zugegeben.

**[0059]** Wie in Tabelle 10 gezeigt, wurde Panthenol durch NMR eindeutig detektiert, wenn sowohl Pantoat als auch 3-Aminopropanol in die Fermentation co-eingespeist wurden.

Tabelle 10. Herstellung von Panthenol in Pantoat- und 3-Aminopropanol-Co-Einspeisungs-Fermentation von Stamm PA207 (PA49 ΔpanD::spec)

Zeit	3-Aminopropanol (g/Liter) <sup>a</sup>	Pantothenat (g/Liter) <sup>a</sup>	Pantoat (g/Liter) <sup>a</sup>	Panthenol (g/Liter) <sup>a</sup>
6,6	0,0	0,01	0,1	0,00
24,4	0,0	0,03	0,9	0,00
30,6	10,2	0,02	1,65	0,00
47,0	25,5	0,00	14,2	0,05
54,7	24,1	0,33	13,6	0,21
71,0	20,6	0,44	11,6	0,14

<sup>a</sup> Durchschnitt von drei Proben.

## Sequenzprotokoll

<110> DSM IP Assets B.V.  
> <120> Fermentative Produktion von Panthenol  
<130> 25537  
<160> 38  
> <170> PatentIn version 3.2  
  
<210> 1  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> künstlich  
  
<220>  
<223> Primer  
  
<400> 1  
atgcgctagc cgaaaattgg ataaaagtggg 30  
  
<210> 2  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> künstlich  
  
<220>  
<223> Primer  
  
<400> 2  
atgcatcgat aagtacagtc ggcattatct cata 34  
  
<210> 3  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> künstlich  
  
<220>  
<223> Primer  
  
<400> 3  
atgcgaattc gggtatggca ttctcaagaa gg 32  
  
<210> 4  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> künstlich  
  
<220>  
<223> Primer  
  
<400> 4  
atgcggatcc gccgtcaagc actgtctgg. 29

<210> 5  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> künstlich

<220>  
<223> Primer

<400> 5  
atgcatcgat ggaagtatac caaaaatcaac gg

32

<210> 6  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> künstlich

<220>  
<223> Primer

<400> 6  
atgcgctagc atgaaaacaa aactggattt tc

32

<210> 7  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> künstlich

<220>  
<223> Primer

<400> 7  
ccttattgaa ttatTTctc aggccg

26

<210> 8  
<211> 46  
<212> DNA  
<213> künstlich

<220>  
<223> Primer

<400> 8  
ggactgatct ccaagcgatg gatggaagta tacaaaaatc aacggc

46

<210> 9  
<211> 47  
<212> DNA  
<213> künstlich

<220>  
<223> Primer

<400> 9  
tcgagaatta aaggagggtt tcatatgaaa acaaaactgg attttct

47

<210> 10  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> künstlich

<220>  
<223> Primer

<400> 10  
cggatatgct tcaaaatctt cattagg 27

<210> 11  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> künstlich

<220>  
<223> Primer

<400> 11  
ctactatttc aacacagcta tctgc 25

<210> 12  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> künstlich

<220>  
<223> Primer

<400> 12  
ggcagccgtgt ggtttcaggt gg 22

<210> 13  
<211> 48  
<212> DNA  
<213> künstlich

<220>  
<223> Primer

<400> 13  
attatgtctt ttgcgcagtc ggccgtctgc ttatcaacta taaaacgc 48

<210> 14  
<211> 48  
<212> DNA  
<213> künstlich

<220>  
<223> Primer

<400> 14

cattcaattt tgagggttgc caggcctatt atttgtcact ttatcacg	48
<210> 15	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> künstlich	
<220>	
<223> Primer	
<400> 15	
ccagtcatttc gcgccacatg tcc	23
<210> 16	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> künstlich	
<220>	
<223> Primer	
<400> 16	
ggactgatct ccaagcgatg ggaattttt aaataaagcg tttacaatat	50
<210> 17	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> künstlich	
<220>	
<223> Primer	
<400> 17	
tcgagaattt aaggagggtt tcatatgaaa attggaatta tcggcggag	49
<210> 18	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> künstlich	
<220>	
<223> Primer	
<400> 18	
gagacagatt actgatattt cacagc	26
<210> 19	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> künstlich	
<220>	
<223> Primer	

<400> 19		
cccaactttat ccaattttcg aacacgtctg tgcgctttc		40
<210> 20		
<211> 46		
<212> DNA		
<213> künstlich		
<220>		
<223> Primer		
<400> 20		
taaacctggcc cgtagttga acgagaaaatg gagagaatat aatatg		46
<210> 21		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> künstlich		
<220>		
<223> Primer		
<400> 21		
tcagaacagc cactttcggc		20
<210> 22		
<211> 43		
<212> DNA		
<213> künstlich		
<220>		
<223> Primer		
<400> 22		
taaacctggcc cgtagttga acgaaccagc ccgtacaatt ttg		43
<210> 23		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> künstlich		
<220>		
<223> Primer		
<400> 23		
gattagagat tccagtaagc tgctc		25
<210> 24		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> künstlich		
<220>		
<223> Primer		

<400> 24  
aaacctgagc aagcagaagg cgca 24

<210> 25  
<211> 55  
<212> DNA  
<213> künstlich

<220>  
<223> Primer

<400> 25  
acatgttattc acgaacgaaa atcgacatga tctgcacctt ttttatcttt attcg 55

<210> 26  
<211> 52  
<212> DNA  
<213> künstlich

<220>  
<223> Primer

<400> 26  
attttagaaa acaataaaacc cttgcaatgg cagaattacg cagtaatatg at 52

<210> 27  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> künstlich

<220>  
<223> Primer

<400> 27  
aatgaagcg ctcccttcttt cttcg 25

<210> 28  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> künstlich

<220>  
<223> Primer

<400> 28  
atggcagaat tacgcagtaa tatgat 26

<210> 29  
<211> 43  
<212> DNA  
<213> künstlich

<220>

&lt;223&gt; Primer

<400> 29  
cccactttat ccaatttcg cgtcggaatg ttgatgcgca ttg 43<210> 30  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> künstlich<220>  
<223> Primer<400> 30  
taacctgccc cgtagttga acggcgtaca gaatgggatt acaag 45<210> 31  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> künstlich<220>  
<223> Primer<400> 31  
gcacttgtca caagttttaga ataacg 26<210> 32  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> künstlich<220>  
<223> Primer<400> 32  
ggactgatct ccaagcgatg gcatgatctg caccttttt atctttattc g 51<210> 33  
<211> 50  
<212> DNA  
<213> künstlich<220>  
<223> Primer<400> 33  
tcgagaatta aaggagggtt tcatatggca gaattacgca gtaatatgat 50<210> 34  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> künstlich

```

<220>
<223> Primer

<400> 34
ctactatttc aacacagcta tctgc                                25

<210> 35
<211> 20
<212> DNA
<213> künstlich

<220>
<223> Primer

<400> 35
ccgatgcctg gaggagcttc                                         20

<210> 36
<211> 48
<212> DNA
<213> künstlich

<220>
<223> Primer

<400> 36
acatgtattc acgaacgaaa atcgaaagaa aagccccctt tatcgaaaaa      48

<210> 37
<211> 54
<212> DNA
<213> künstlich

<220>
<223> Primer

<400> 37
attttagaaa acaataaacc cttgcaatta tattctctcc atttctcgaa tatac   54

<210> 38
<211> 25
<212> DNA
<213> künstlich

<220>
<223> Primer

<400> 38
cgcgcatattga tgaaaccatc gaaac                                25

```

### Zusammenfassung

**[0060]** Verfahren zur Herstellung von Panthenol durch das Kultivieren eines Mikroorganismus, der mindestens ein Enzym, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den Enzymen in der Pantoatbiosynthese und PanC, überexprimieren kann, unter geeigneten Kultivierungsbedingungen unter gleichzeitiger Einspeisung von 3-Aminopropanol oder einem geeigneten Derivat davon und gegebenenfalls Gewinnen des Panthenols aus dem Zellkultivierungsmedium.

**ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG**

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

**Zitierte Patentliteratur**

- CN 1367253 [0005]
- EP 859848 B1 [0008]
- WO 01/21772 [0008, 0015]
- WO 97/10340 [0015]
- EP 1001027 [0015]
- EP 1006189 [0015]
- WO 01/92556 [0015]
- EP 1167520 [0015]
- WO 02/24936 [0015]
- WO 02/29020 [0015]
- WO 02/055711 [0015]
- WO 02/057474 [0015]
- WO 02/057476 [0015]
- WO 02/061108 [0015]
- WO 02/064806 [0015]
- WO 02/072838 [0015]
- WO 02/072840 [0015]
- WO 02/072854 [0015]
- WO 02/072855 [0015]
- EP 1247868 [0015]
- WO 03/004672 [0015]
- WO 03/006664 [0015]
- DE 10201540 A1 [0015]
- WO 03/029476 [0015]
- WO 2004/005525 [0015]
- WO 2004/005527 [0015]

**Zitierte Nicht-Patentliteratur**

- Schnider, O.: Synthesis of Panthenol and its transformation into pantothenic acid. Jubiläumsband Emil Barrell 1946, 85–91 [0003]
- Lee et. al., 1980, Mol. Gen. Genet. 180: 57–65 und Moran et. al., 1982, Mol. Gen. Genet. 186: 339–46 [0018]
- Guerout-Fleury et. al., 1995 [0030]
- Guerout-Fleury et. al., 1995 [0030]
- Lee et. al., 1980, Mol. Gen. Genet. 180: 57–65 [0030]
- Hümbelin et. al., 1999, J. Ind. Microbiol. Biotech. 22: 1–7 [0030]
- Perkins et. al., 1999, J. Ind. Microbiol. Biotech. 22: 8–18 [0030]
- Lee et. al., 1980 [0040]
- Wach, 1996 [0040]
- Guerout-Fleury et. al., 1995 [0042]

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur Herstellung von Panthenol durch das Kultivieren eines Mikroorganismus, der mindestens ein Enzym, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den Enzymen in der Pantoatbiosynthese und PanC, überexprimieren kann, unter geeigneten Kultivierungsbedingungen unter gleichzeitiger Einspeisung von 3-Aminopropanol oder einem geeigneten Derivat davon und gegebenenfalls Gewinnen des Panthenols aus dem Zellkultivierungsmedium.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Mikroorganismus der Gattung Bacillus angehört.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei der Mikroorganismus Bacillus subtilis ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei mindestens eines der Enzyme PanB, PanC, PanE und ilvD überexprimiert wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei PanE überexprimiert wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei PanB überexprimiert wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei PanC überexprimiert wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei PanD inaktiviert wird.
9. Verwendung von PanC oder einer Mutante davon mit erhöhter katalytischer Aktivität in einem Verfahren zur Herstellung von Panthenol aus 3-Aminopropanol oder einem Derivat davon und Pantoat.
10. Panthenol, hergestellt gemäß einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen