

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
26. November 2009 (26.11.2009)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2009/141330 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

C12P 13/04 (2006.01) *C12N 15/31* (2006.01)
C12P 13/08 (2006.01) *C12N 15/77* (2006.01)
C07K 14/35 (2006.01) *C12R 1/15* (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2009/056046

(22) Internationales Anmeldedatum:
19. Mai 2009 (19.05.2009)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2008 001 874.0 20. Mai 2008 (20.05.2008) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **EVONIK DEGUSSA GMBH** [DE/DE]; Rellinghauser Straße 1-11, 45128 Essen (DE). **FRIEDRICH-ALEXANDER UNIVERSITÄT ERLANGEN-NÜRNBERG** [DE/DE]; Schlossplatz 4, 91054 Erlangen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **JESSBERGER, Nadja** [DE/DE]; Doktor-Wilhelm-Schaeffler-Str. 22, 91074 Herzogenaurach (DE). **BURKOVSKI, Andreas** [DE/DE]; Luitpoldstr. 61, 91052 Erlangen (DE). **BATHE, Brigitte** [DE/DE]; Twieten 1, 33154 Salzkotten (DE). **RETH, Alexander** [DE/DE]; Julius-Leber-Strasse 2a, 33615 Bielefeld (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, ST, 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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, 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:

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



WO 2009/141330 A1

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

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

(57) Abstract: The object of the invention is a method for manufacturing L-amino acids using coryneform bacteria in which the AmtR regulator has been weakened, and corresponding recombinant bacteria, polynucleotides and vectors.

(57) Zusammenfassung: Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen der AmtR-Regulator abgeschwächt worden ist, sowie die entsprechenden rekombinanten Bakterien, Polynukleotide und Vektoren.

Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen der AmtR-Regulator abgeschwächt worden ist.

Stand der Technik

L-Aminosäuren findet in der Humanmedizin, in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

- 10 Es ist bekannt, dass L-Aminosäuren, wie beispielsweise das L-Lysin, durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere *Corynebacterium glutamicum*, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet.
- 15 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
- 20 zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

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

- 30 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

modifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

Zusammenfassende Darstellungen zur Biologie, Genetik und Biotechnologie von *Corynebacterium glutamicum* sind im
5 „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,
10 (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* ATCC13032 ist bei Ikeda und Nakagawa (Applied
15 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 glutamicum*
20 R ist bei Yukawa et al. (Microbiology 153(4):1042-1058 (2007)) beschrieben.

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

25 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,
30 Mishima, Japan) oder in der Nukleotidsequenz-Datenbank der European Molecular Biologies Laboratories (EMBL, Heidelberg, Deutschland bzw. Cambridge, UK) verfügbar.

Die Entschlüsselung des *Corynebacterium glutamicum* Genoms ermöglichte unter Anderem weitreichende Untersuchungen zum
35 Stoffwechsel und regulatorischen Netzwerk dieses Bakteriums

(Silberbach und Burkovski, Journal of Biotechnology 126(1): 101-110 (2006)).

Eine wesentliche Voraussetzung für die Synthese von Aminosäuren sowie generell für die Vermehrung der Zellen ist eine adäquate Versorgung mit Stickstoff. *C. glutamicum* ist in der Lage, verschiedene Stickstoffquellen, darunter Ammonium, L-Glutaminsäure, Glutamin und Harnstoff, zu verwerten. In Abhängigkeit von Konzentration und Art der verfügbaren Stickstoffquelle werden bestimmte Enzyme und Transportsysteme synthetisiert bzw. aktiviert. Aus energetischen Gründen ist eine strikte Regulation ("Stickstoff-Kontrolle") notwendig. Die Regulation der Genexpression und die globale Signaltransduktion im Stickstoff-Metabolismus von *C. glutamicum* wurde von verschiedenen Autoren detailliert untersucht.

Die Expression Stickstoff-regulierter Gene wird in *C. glutamicum* durch den globalen Repressor AmtR reguliert. AmtR reprimiert bei guter Stickstoff-Versorgung die Expression der Gene des *amt-soxA-ocd*-Operons, des *gltBD*-Operons, des *amtB-glnK-glnD*-Operons sowie der Gene *glnA* und *crnT* (Jacoby et al., *Molecular Microbiology* 37: 964-977 (2000); Beckers et al., *Microbiology*, 147: 2961-2170 (2001); Nolden et al., *FEMS Microbiological Letters* 201: 91-98 (2001)). Bei weiteren Untersuchungen (Beckers et al., *Journal of Bacteriology* 186(22): 7645-52 (2004); Beckers et al., *Molecular Microbiology* 58(2): 580-595 (2005)) konnte unter anderem auch für die Gene des *gluABCD*-Operons, des *NCgl1915-1918*-Operons, des *urtABCDE*-Operons, des *ureABCEFGD*-Operons sowie das *codA*-Gen und das *NCgl1099*-Gen eine AmtR-abhängige Regulation gezeigt werden.

In der EP 1 460 128 wird über die Auswirkung der Deletion des *amtR*-Gens in einem Δ *argR*-Stamm auf die Produktion verschiedener Aminosäuren berichtet.

Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt neue Maßnahmen zur verbesserten Herstellung von L-Aminosäuren, bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

- 5 Gegenstand der Erfindung ist ein rekombinantes, L-Aminosäure ausscheidendes, coryneformes Bakterium bei dem das amtR-Gen, das für einen AmtR-Regulator kodiert, dessen Aminosäuresequenz zu mindestens 85% oder zu mindestens 90%, bevorzugt zu mindestens 95%, besonders bevorzugt zu
- 10 mindestens 98% oder zu mindestens 99% und ganz besonders bevorzugt identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2 und im Wesentlichen eine Länge von 222 Aminosäuren umfasst, abgeschwächt worden ist, durch eine oder mehrere der Maßnahmen ausgewählt aus der Gruppe
- 15 a. Substitution der Nukleobase Guanin an Position 7 der Promotorregion des amtR-Gens gemäß SEQ ID NO:5 durch Thymin,
- b. Substitution der Nukleobase Cytosin an Position 11 der Promotorregion des amtR-Gens gemäß SEQ ID NO:5 durch
- 20 Guanin,
- c. Substitution der Nukleobase Thymin an Position 40 der Promotorregion des amtR-Gens gemäß SEQ ID NO:5 durch Guanin,
- d. Substitution der Nukleobase Thymin an Position 45 der Promotorregion des amtR-Gens gemäß SEQ ID NO:5 durch
- 25 Guanin,
- e. Deletion einer oder mehrerer der Nukleobasen von Position 40 bis 45, bevorzugt Deletion sämtlicher Nukleobasen von Position 40 bis 45, der Promotorregion des amtR-Gens gemäß SEQ ID NO:5,
- 30 f. Deletion einer oder mehrerer der Nukleobasen zwischen Position 72 und 78 der Promotorregion des amtR-Gens gemäß SEQ ID NO:5,

- g. Substitution einer oder mehrerer der Nukleobasen Adenin oder Guanin zwischen Position 72 und 78 der Promotorregion des amtR-Gens gemäß SEQ ID NO:5 gegen Thymin oder Cytosin,
- 5 h. Austausch des ATG Startkodons an Position 1 bis 3 der Kodierregion des amtR-Gens gegen ein GTG oder TTG Startkodon,
- i. Austausch des Glycin an Position 3 der Aminosäuresequenz gegen eine andere proteinogene L-Aminosäure, bevorzugt L-Glutaminsäure oder L-Asparaginsäure, besonders bevorzugt L-Glutaminsäure,
- 10 j. Austausch des L-Isoleucin an Position 24 der Aminosäuresequenz gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Glutamin, L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure, bevorzugt L-Asparaginsäure,
- 15 k. Austausch des L-Leucin an Position 31 der Aminosäuresequenz gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-Prolin, L-Asparagin, L-Glutamin, L-Phenylalanin, L-Tyrosin, L-Tryptophan, L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure, bevorzugt L-Prolin,
- 20 l. Austausch des L-Phenylalanin an Position 32 der Aminosäuresequenz gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Glycin, L-Glutaminsäure , L-Asparaginsäure, L-Prolin und L-Cystein, bevorzugt L-Prolin,
- 25 m. Austausch des Glycin an Position 36 der Aminosäuresequenz gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-Glutaminsäure , L-Asparaginsäure, L-Isoleucin, L-Histidin und L-Phenylalanin, bevorzugt L-Histidin, L-Glutaminsäure oder L-Asparaginsäure,
- 30 n. Austausch des L-Threonin an Position 42 der Aminosäuresequenz gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-Prolin, L-Isoleucin, L-Methionin, L-Glutamin, L-Tryptophan, L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure, bevorzugt L-Glutaminsäure,
- 35

- o. Austausch des Glycin an Position 50 der Aminosäuresequenz gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-Glutaminsäure, L-Asparaginsäure, L-Isoleucin, L-Histidin, L-Tryptophan und L-Phenylalanin, bevorzugt L-Tryptophan,
5
- p. Austausch des L-Glutamin an Position 53 der Aminosäuresequenz gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-Cystein, L-Methionin, L-Tyrosin, L-Tryptophan und L-Phenylalanin, bevorzugt L-Phenylalanin,
10
- q. Austausch des L-Alanin an Position 54 der Aminosäuresequenz gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-Phenylalanin, L-Isoleucin, L-Tryptophan, L-Tyrosin, L-Histidin, L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure, bevorzugt L-Histidin,
15
- r. Austausch des L-Serin an Position 55 der Aminosäuresequenz gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-Prolin, L-Phenylalanin, L-Tryptophan, L-Lysin, L-Arginin, L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure, bevorzugt L-Phenylalanin,
20
- s. Austausch des L-Tyrosin an Position 57 der Aminosäuresequenz gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-Prolin, Glycin, L-Methionin, L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure, bevorzugt L-Asparaginsäure,
25
- t. Austausch des L-Tyrosin an Position 58 der Aminosäuresequenz gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-Prolin, L-Methionin und L-Cystein, bevorzugt L-Prolin,
- 30 u. Austausch des L-Histidin an Position 59 der Aminosäuresequenz gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-Lysin, L-Asparaginsäure, L-Isoleucin, L-Prolin und Glycin, bevorzugt L-Prolin, und
- v. Austausch des L-Lysin an Position 63 der Aminosäuresequenz gegen eine Aminosäure ausgewählt aus
35

der Gruppe L-Alanin, L-Glutaminsäure, L-Asparaginsäure, L-Asparagin, L-Tyrosin und L-Tryptophan, bevorzugt L-Asparagin.

Für die Herstellung der erfindungsgemäßen Bakterien werden
5 coryneforme Bakterien eingesetzt. Unter den coryneformen Bakterien wird die Gattung *Corynebacterium* bevorzugt. Innerhalb der Gattung *Corynebacterium* werden Stämme bevorzugt, die auf folgenden Arten beruhen:

10 *Corynebacterium efficiens*, wie zum Beispiel der Typstamm DSM44549,

Corynebacterium glutamicum, wie zum Beispiel der Typstamm ATCC13032 oder der Stamm R, und

Corynebacterium ammoniagenes, wie zum Beispiel der Stamm ATCC6871,

15 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:

20 *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870,
Corynebacterium lilium DSM20137,
Corynebacterium melassecola ATCC17965,
Brevibacterium flavum ATCC14067,
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869, und
25 *Brevibacterium divaricatum* ATCC14020.

Der Begriff „*Micrococcus glutamicus*“ für *Corynebacterium glutamicum* war ebenfalls gebräuchlich.

Einige Vertreter der Art *Corynebacterium efficiens* wurden im Stand der Technik auch als *Corynebacterium*
30 *thermoaminogenes* bezeichnet, wie zum Beispiel der Stamm FERM BP-1539.

Die für die Maßnahmen der Abschwächung eingesetzten Stämme coryneformer Bakterien (Ausgangsstämme) besitzen bevorzugt

bereits die Fähigkeit die gewünschte(n) L-Aminosäure(en) in der Zelle anzureichern oder in das sie umgebende Nährmedium auszuschleiden und dort zu akkumulieren. Hierfür wird im Folgenden auch der Ausdruck „produzieren“ verwendet.

- 5 Insbesondere besitzen die für die Maßnahmen der Abschwächung eingesetzten Stämme coryneformer Bakterien die Fähigkeit \geq (mindestens) 0,25 g/l, \geq 0,5 g/l, \geq 1,0 g/l, \geq 1,5 g/l, \geq 2,0 g/l, \geq 4 g/l oder \geq 10 g/l der gewünschten Verbindung in \leq (maximal) 120 Stunden, \leq 96 Stunden, \leq 48
- 10 Stunden, \leq 36 Stunden, \leq 24 Stunden oder \leq 12 Stunden in der Zelle oder im Nährmedium anzureichern bzw. zu akkumulieren. Bei den Ausgangsstämmen handelt es sich bevorzugt um Stämme, die durch Mutagenese und Selektion, durch rekombinante DNA-Techniken oder durch eine
- 15 Kombination beider Methoden hergestellt wurden.

- Es ist offensichtlich und bedarf keiner weiteren Erklärungen, dass man zu einem erfindungsgemäßen Bakterium auch dadurch gelangen kann, indem man in einem Wildstamm, wie zum Beispiel in dem Typstamm ATCC13032 oder in dem
- 20 Stamm ATCC14067, zunächst das amtR-Gen mit Hilfe der Maßnahmen der Erfindung abschwächt und anschließend durch geeignete weitere genetische Massnahmen, das Bakterium veranlasst, die gewünschte(n) L-Aminosäure(en) zu produzieren.

- 25 Der Begriff L-Aminosäuren umfasst die proteinogenen Aminosäuren, sowie L-Ornithin und L-Homoserin. Unter proteinogenen L-Aminosäuren versteht man die L-Aminosäuren die in natürlichen Proteinen, das heißt in Proteinen von Mikroorganismen, Pflanzen, Tieren und Menschen, vorkommen.
- 30 Zu den proteinogenen Aminosäuren zählen L-Asparaginsäure, L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutaminsäure, L-Glutamin, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan, L-Arginin,
- 35 L-Prolin und gegebenenfalls L-Selenocystein und L-Pyrrolysin. Bevorzugt werden die L-Aminosäuren L-Lysin, L-Glutaminsäure, L-Glutamin, L-Arginin, L-Prolin und L-Ornithin. Besonders bevorzugt wird L-Lysin.

Werden im Folgenden Aminosäuren oder L-Aminosäuren erwähnt, umfasst der Begriff auch deren Salze wie beispielsweise das Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat im Falle der Aminosäure L-Lysin.

- 5 Bekannte Vertreter L-Lysin produzierender bzw. ausscheidender Stämme coryneformer Bakterien sind beispielsweise:

Corynebacterium glutamicum DM58-1/pDM6 (= DSM4697)
beschrieben in EP 0 358 940,

- 10 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,

- 15 Corynebacterium glutamicum NRRL B-11474
beschrieben in US 4,275,157,

Corynebacterium glutamicum DSM13994
beschrieben in US 6,783,967

- 20 Corynebacterium glutamicum DSM16834
beschrieben in WO 06/063660,

Corynebacterium glutamicum DSM17119
beschrieben in WO 06/100211,

Corynebacterium glutamicum DSM17223
beschrieben in WO 06/125714,

- 25 Corynebacterium glutamicum DSM16937
beschrieben in WO 06/077004, und

Corynebacterium thermoaminogenes AJ12521
(= FERM BP-3304) beschrieben in US 5,250,423.

- 30 Angaben zur taxonomischen Einordnung von Stämmen der Gruppe
der coryneformen Bakterien findet man unter anderem bei
Seiler (Journal of General Microbiology 129, 1433-1477

(1983)), Kinoshita (1985, *Glutamic Acid Bacteria*, p 115-142. In: Demain and Solomon (ed), *Biology of Industrial Microorganisms*. The Benjamin/Cummins Publishing Co., London, UK), Kämpfer und Kroppenstedt (*Canadian Journal of Microbiology* 42, 989-1005 (1996)), Liebl et al (International Journal of Systematic Bacteriology 41, 255-260 (1991)), Fudou et al (*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 1127-1131 (2002)) und in der US-A-5,250,434.

10 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
15 Bezeichnung „NRRL“ können von der Agricultural Research Service Patent Culture Collection (ARS, Peoria, Illinois, US) bezogen werden. Stämme mit der Bezeichnung „FERM“ können vom National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST Tsukuba Central 6, 1-1-1
20 Higashi, Tsukuba Ibaraki, Japan) bezogen werden.

L-Lysin produzierende coryneforme Bakterien besitzen typischerweise eine „feed back“ resistente bzw. desensibilisierte Aspartatkinase. Unter „feed back“ resistenten Aspartatkinasen versteht man Aspartatkinasen
25 (LysC), die im Vergleich zur Wildform (Wildtyp) 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. Die für diese im Vergleich zum Wildtyp
30 desensibilisierten Aspartatkinasen kodierenden Gene bzw. Allele werden auch als lysC^{FBR}-Allele bezeichnet. Im Stand der Technik sind zahlreiche lysC^{FBR}-Allele beschrieben, die für Aspartatkinasevarianten kodieren, welche
35 Aminosäureaustausche im Vergleich zum Wildtypprotein besitzen. Die Kodierregion des Wildtyp lysC-Gens von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 entsprechend der Zugangsnummer AX756575 der NCBI Datenbank ist in SEQ ID NO:7 und das von diesem Gen kodierte Polypeptid in SEQ ID

NO:8 dargestellt. Die Aminosäuresequenz der Wildform der Aspartatkinase variiert geringfügig bei verschiedenen Wildtypstämmen von *Corynebacterium glutamicum*. So enthält die Aspartatkinase des Wildtypstammes *Corynebacterium*
5 *glutamicum* ATCC14067 an Position 317 Alanin. Die Wildtyp-Aspartatkinase von Stamm ATCC 13032 enthält an dieser Position Serin wie in SEQ ID NO:8 dargestellt.

Die für die Maßnahmen der Erfindung eingesetzten L-Lysin produzierenden coryneformen Bakterien verfügen bevorzugt
10 über ein *lysC*-Allel, das für eine Aspartatkinasevariante kodiert, welche die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:13 besitzt, wobei diese eine oder mehrere der Aminosäureaustausche ausgewählt aus der Gruppe:

15 *LysC* A279T (Austausch von L-Alanin an Position 279 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 13 gegen L-Threonin; siehe US 5,688,671 und Zugangsnummern E06825, E06826, E08178 und I74588 bis I74597),

20 *LysC* A279V (Austausch von L-Alanin an Position 279 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 13 gegen L-Valin; siehe JP 6-261766 und Zugangsnummer E08179),

25 *LysC* L297Q (Austausch von L-Leucin an Position 297 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 13 gegen L-Glutamin; siehe DE 102006026328,

LysC S301F (Austausch von L-Serin an Position 301 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 13 gegen L-Phenylalanin; siehe US 6,844,176 und Zugangsnummer E08180),

30 *LysC* S301Y (Austausch von L-Serin an Position 301 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 13 gegen L-Tyrosin; siehe Kalinowski et al. (Molecular and General Genetics 224, 317-324 (1990)) und Zugangsnummer X57226),

- LysC T308I (Austausch von L-Threonin an Position 308 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 13 gegen L-Isoleucin; siehe JP 6-261766 und Zugangsnummer E08181)
- 5 LysC T311I (Austausch von L-Threonin an Position 311 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 13 gegen L-Isoleucin; siehe WO 00/63388 und US 6,893,848),
- 10 LysC R320G (Austausch von L-Arginin an Position 320 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 13 gegen Glycin; siehe Jetten et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 43, 76-82 (1995)) und Zugangsnummer L27125),
- 15 LysC G345D (Austausch von Glycin an Position 345 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 13 gegen L-Asparaginsäure; siehe Jetten et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 43, 76-82 (1995)) und Zugangsnummer L16848),
- 20 LysC T380I (Austausch von L-Threonin an Position 380 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 13 gegen L-Isoleucin; siehe WO 01/49854 und Zugangsnummer AX192358), und
- 25 LysC S381F (Austausch von L-Serin an Position 381 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 13 gegen L-Phenylalanin; siehe EP 0435132)
- umfasst, wobei ggf. an Position 317 anstelle L-Serin L-Alanin enthalten ist.
- Besonders bevorzugt werden das lysC^{FBR}-Allel lysC T311I (Austausch von Threonin an Position 311 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 13 gegen Isoleucin) und ein lysC^{FBR}-Allel enthaltend mindestens einen Austausch ausgewählt aus der Gruppe A279T (Austausch von Alanin an Position 279 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 13 gegen Threonin), S381F (Austausch von Serin an Position 381 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ
- 30
- 35

ID NO: 13 gegen Phenylalanin), wobei gegebenenfalls das Serin an Position 317 gegen Alanin ausgetauscht ist (S317A).

5 Ganz besonders bevorzugt wird das lysC^{FBR}-Allel lysC T311I (Austausch von Threonin an Position 311 des kodierten Aspartatkinaseproteins gemäß SEQ ID NO: 13 gegen Isoleucin), wobei gegebenenfalls das Serin an Position 317 gegen Alanin ausgetauscht ist (S317A).

10 Der Stamm DSM 16833 (WO 06/063660) besitzt ein lysC^{FBR}-Allel, das für ein Aspartatkinaseprotein kodiert, welches den Aminosäureaustausch T311I enthält.

Der Stamm NRRL B-11474 (US 4,275,157) besitzt ein lysC^{FBR}-Allel, das für ein Aspartatkinaseprotein kodiert, welches den Aminosäureaustausch S381F enthält.

15 Es hat sich weiterhin als vorteilhaft für die Lysinproduktion herausgestellt, die lysC^{FBR}-Allele zu überexprimieren.

In einer weiteren Ausführungsform besitzen die für die Massnahmen der Erfindung eingesetzten L-Lysin
20 produzierenden 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:

- 25 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,
- 30 c) überexprimiertes Polynukleotid (ddh-Gen), das für eine meso-Diaminopimelate Dehydrogenase (Ddh, EC Nr. 1.4.1.16) kodiert,

- d) überexprimiertes Polynukleotid, (lysA-Gen), das für eine Diaminopimelat-Decarboxylase (LysA, EC Nr. 4.1.1.20) kodiert,
- e) überexprimiertes Polynukleotid (aat-Gen), das für eine Aspartat-Aminotransferase (Aat, EC Nr. 2.6.1.1) kodiert,
- f) überexprimiertes Polynukleotid (lysE-Gen), das für eine Polypeptid mit L-Lysin-Export Aktivität (LysE, Lysin Efflux Permease) kodiert,
- g) überexprimiertes Polynukleotid, das für eine Pyruvat-Carboxylase (Pyc, EC Nr. 6.4.1.1) kodiert, und
- h) überexprimiertes Polynukleotid (dapB-Gen), das für eine Dihydrodipicolinat-Synthase (DapB, EC Nr. 1.3.1.26) kodiert.

Hierfür können die im Stand der Technik beschriebenen Gene von Bakterien verwendet werden. Bevorzugt werden die endogenen Gene bzw. Polynukleotide der Gattung *Corynebacterium*, besonders bevorzugt die der Art *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium efficiens* und *Corynebacterium ammoniagenes* und ganz besonders bevorzugt die 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 ddh-Gen ist beispielsweise bei Ishino et al. (Agricultural and Biological Chemistry 52(11), 2903-2909 (1988)) 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 Zugangnummer 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), 7693-7646 (2005) bezeichnen das aat-Gen als aspT-Gen.

Das lysE-Gen von *Corynebacterium glutamicum* R127 ist beispielweise in der US 6,858,406 beschrieben. 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 Überexpression versteht man allgemein eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration oder Aktivität einer Ribonukleinsäure, eines Proteins (Polypeptids) oder eines Enzyms im Vergleich zum Ausgangsstamm (Elternstamm) oder
5 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
10 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
15 coryneformen Bakterium repliziert wird. Weiterhin kann man als Vektoren Transposons, Insertionselemente (IS-Elemente) oder Phagen einsetzen. Im Stand der Technik ist eine Fülle geeigneter Vektoren beschrieben.

Eine andere verbreitete Methode zur Erzielung einer
20 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
25 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.
30 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
35 (1999)) beschriebenen 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.

Es ist ebenfalls möglich, zusätzlich zu den Maßnahmen die das amtR-Gen betreffen, einzelne Biosynthesegene abzuschwächen oder auszuschalten.

So ist es gegebenenfalls zweckmäßig für die Verbesserung der Produktion von L-Lysin, L-Valin oder L-Isoleucin, bevorzugt L-Lysin, eines oder mehrere der Gene ausgewählt aus der Gruppe

- a) ein für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase (Pgi, EC Nr. 5.3.1.9) kodierendes Gen pgi, wie beispielsweise das in der US 6,586,214 und US 6,465,238 beschriebene pgi-Gen von *Corynebacterium glutamicum*,
- b) ein für die Malat-Dehydrogenase (Mdh, EC Nr. 1.1.1.37) kodierendes Gen mdh, wie beispielsweise in der WO 02/02778 beschrieben,
- c) ein für die Malat-Chinon Oxidoreduktase (Mqo, EC Nr. 1.1.99.16) kodierendes Gen mqo, wie beispielsweise in der US 7,094,106 und PCT/EP2005/057216 beschrieben, und
- d) ein für die Elp Untereinheit des Pyruvat-Dehydrogenase Komplexes kodierendes aceE-Gen (AceE, EC Nr. 1.2.4.1), wie beispielsweise in der EP-A-1767616 beschrieben,

abzuschwächen oder auszuschalten.

Diese Massnahmen können im Falle der L-Lysin Produktion auch zusätzlich zur Verwendung von lysC^{FBR}-Allelen und/oder der Überexpression eines oder mehrerer Gene ausgewählt aus
5 der Gruppe dapA, dapB, asd, ddh, lysA, aat, lysE und pyc durchgeführt werden.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme
10 (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder
15 Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Im Falle des AceE-Polypeptides (siehe SEQ ID NO:2 von EP-A-1767616) kann die Abschwächung auch durch einen oder mehrere der Aminosäureaustausche ausgewählt aus der Gruppe
20 a) Austausch von Ala an Position 225 gegen Val, Leu oder Ile, bevorzugt Val, b) Austausch von Gly an Position 255 gegen Ser oder Thr, bevorzugt Ser, c) Austausch von Asn an Position 282 gegen Gln, und d) Austausch des Cys an Position 283 gegen eine andere Aminosäure, bevorzugt Ser,
25 erzielt werden, wobei folgende Austausche ausgewählt aus der Gruppe e) Austausch an Position 282, f) gleichzeitiger Austausch an den Positionen 225 und 283, und g) gleichzeitiger Austausch an den Positionen 255 und 283, bevorzugt werden.

30 Die Konzentration eines Proteins kann über 1- und 2-dimensionale Proteingelaufreinigung und anschließende optische Identifizierung der Proteinkonzentration mit entsprechender Auswertesoftware im Gel bestimmt werden. Eine gebräuchliche Methode zur Präparation der Proteingele
35 bei coryneformen Bakterien und zur Identifizierung der Proteine ist die von Hermann et al. (Electrophoresis, 22:1712-23 (2001)) beschriebene Vorgehensweise. Die

Proteinkonzentration kann ebenfalls durch Western-Blot-Hybridisierung mit einem für das nachzuweisende Protein spezifischen Antikörper (Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) und anschließender optischer Auswertung mit entsprechender Software zur Konzentrationsbestimmung (Lohaus und Meyer (1998) Biospektrum 5:32-39; Lottspeich, Angewandte Chemie 38: 2476-2492 (1999)) bestimmt werden. Die Aktivität kann mit Hilfe eines geeigneten Enzymtest bestimmt werden.

Bei dem AmtR-Regulator, der im Folgenden auch als AmtR-Polypeptid oder Transkriptionsregulator AmtR bezeichnet wird, handelt es sich um ein Polypeptid mit der Aktivität eines Transkriptionsregulators, der bei Stickstoffüberschuss in der Zelle die Expression der Gene des Stickstoffstoffwechsels reprimiert. Bei Stickstoffmangel erfolgt die Derepression.

Bei Kultur einer Wildtypstammes eines coryneformen Bakteriums, bevorzugt Corynebacterium glutamicum wie beispielsweise Stamm ATCC 13032, in einem Minimalmedium, welches als Stickstoffquelle Ammonium-Ionen enthält, besteht Stickstoffmangel bei einer Ammonium-Ionen Konzentration von ≤ 5 mM, bevorzugt ≤ 1 mM, besonders bevorzugt $\leq 0,5$ mM.

Der Adenylierungsgrad des Signaltransduktionsproteins GlnK im Cytoplasma des coryneformen Bakteriums gibt ebenfalls Auskunft darüber, ob für die Zelle Stickstoffmangel oder Stickstoffüberschuss besteht. Stickstoffmangel liegt dann vor wenn in der Zelle $\geq 80\%$, bevorzugt $\geq 90\%$, \geq besonders bevorzugt 95% des Signaltransduktionsproteins in adenylierter Form vorliegen.

Zu den Genen des Stickstoffwechsels, die vom AmtR-Regulator bei Stickstoffüberschuss reprimiert werden, zählen unter anderem amtA, amtB, codA, crnT, gdh, glnA, gluA, gltB, ureA und urtA (Tabelle 1 auf Seite 584 bei Beckers et al. (Molecular Microbiology 58(2), 580-595 (2005))).

Die Aminosäuresequenz des AmtR-Regulators coryneformer Bakterien ist zu mindestens 85% oder zu mindestens 90%, bevorzugt zu mindestens 95%, besonders bevorzugt zu mindestens 98% oder zu mindestens 99% identisch mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2 und umfasst oder besitzt im Wesentlichen eine Länge von 222 Aminosäuren, wobei eine Länge von 222 Aminosäuren bevorzugt wird. Ein Beispiel für einen AmtR-Regulator der mindestens 98% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2 ist der von Stamm ATCC14067. Er ist in SEQ ID NO:21 aufgeführt. Ganz besonders bevorzugt umfasst oder besitzt der AmtR-Regulator die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2. Gegebenenfalls enthält die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2 oder 21, maximal 3, bevorzugt maximal 2, besonders bevorzugt maximal einen konservative(n) Aminosäureaustausch(e). Durch die konservativen Aminosäureaustausche wird die Aktivität des AmtR-Repressors im Wesentlichen nicht verändert.

Der Begriff „im Wesentlichen eine Länge von 222 Aminosäuren“ trägt in diesem Zusammenhang der Tatsache Rechnung, dass durch Insertion oder Deletion einer (1) oder mehrerer, maximal 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 oder 2, Aminosäuren innerhalb des Polypeptids oder am N- oder C-terminalen Ende des Polypeptids die Länge des kodierten Polypeptids bei verschiedenen Arten oder Stämmen L-Aminosäure auscheidender coryneformer Bakterien geringfügig variiert. Ein Beispiel hierfür ist der AmtR-Regulator von Corynebacterium efficiens. Die Länge des Polypeptids (Siehe SEQ ID NO:11) beträgt in diesem Fall 223 Aminosäuren. Die unterschiedliche Länge des AmtR-Regulators ist durch Insertion der Aminosäure L-Glutaminsäure zwischen Position 151 und 153 von SEQ ID NO:2 bedingt.

Nachfolgend sind die Aminosäuren der Aminosäuresequenz des AmtR-Regulators von Corynebacterium efficiens (AmtR Ceff) den Aminosäuren der Aminosäuresequenz des AmtR-Regulators von Corynebacterium glutamicum (AmtR Cglu) zugeordnet.

	AmtR Ceff	1	magavgrprrsaprragknpreieldasaelftrqgfattsthqiadavg
	AmtR Cglu	1	magavgrprrsaprragknpreieldasaelftrqgfattsthqiadavg
5	AmtR Ceff	51	irgaslyyhfpskteifltllkstvepsmvlagdianleaspelrlwalv
	AmtR Cglu	51	irgaslyyhfpskteifltllkstvepstvlaedlstldagpemrlwaiv
	AmtR Ceff	101	aaevrlllstkwnvgrlyqlpivaseefeeyhtqratltdtfrslateiv
10	AmtR Cglu	101	asevrlllstkwnvgrlyqlpivgseefaeyhsqrealtnvfrdlateiv
	AmtR Ceff	151	geddpraelpfhitmsaiemrrndgkvpplsedspldtavmladaalav
	AmtR Cglu	151	g-ddpraelpfhitmsviemrrndgkipplsadsplpetaimladaslav
	AmtR Ceff	201	lgadlpgdrvertlelllrqadak
15	AmtR Cglu	200	lgaplpadrvektlelikqadak

Für die Zuordnung der einzelnen Aminosäuren verschiedener AmtR-Regulatoren können auch sogenannte Alignment-Programme, wie beispielsweise das ClustalW- (Thompson et al., Nucleic Acids Research 25(24), 4876-82 (1997)) oder MAFFT-Programm (Kato et al., Nucleic Acid Res., 30:3059-3066 (2002)) verwendet werden. Die einzelnen Aminosäuren eines Polypeptids können dadurch, trotz formal unterschiedlicher Länge der Aminosäuresequenzen, einander eindeutig zugeordnet werden.

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

Der Ausdruck „wird die Aktivität des AmtR-Repressors im Wesentlichen nicht verändert“ bedeutet, dass durch die

genannten maximal 3 konservativen Aminosäureaustausche, die Fähigkeit des AmtR-Repressors an seine DNA-Bindestelle zu binden um maximal 10 %, bevorzugt maximal 5 %, besonders bevorzugt 1 % und ganz besonders bevorzugt nicht verändert

5 wird. Die Aktivität kann durch Verzögerungsgelelektrophorese (gel retardation assay) unter Verwendung von doppelsträngigen DNA-Molekülen mit der Nukleotidsequenz einer AmtR-Bindestelle des amtA-Gens (Siehe SEQ ID NO:14 und 15), einer AmtR-Bindestelle des

10 amtB-Gens (Siehe SEQ ID NO:16 und 17) oder einer AmtR-Bindestelle des gltB-Gens (Siehe SEQ ID NO:18 und 19), bevorzugt unter Verwendung von doppelsträngigen DNA-Molekülen mit der Nukleotidsequenz einer AmtR-Bindestelle des amtA-Gens und ganz besonders bevorzugt unter Verwendung

15 eines doppelsträngigen DNA-Molekülen mit der Nukleotidsequenz von SEQ ID NO:14 gemessen werden. Die Nukleotidsequenzen sind der Tabelle 1 von Beckers et al. (Molecular Microbiology 58(2), 580-595 (2005)) entnommen.

In der SEQ ID NO: 1 ist die Nukleotidsequenz der

20 Kodierregion des amtR-Gens vom Typstamm von *Corynebacterium glutamicum* (Wildtypgen), das heißt ATCC13032, gemäß der Angaben der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) wiedergegeben. SEQ ID NO:2 und 4 zeigen die Aminosäuresequenz des kodierten Polypeptids. SEQ ID

25 NO:2 und 4 enthalten an Position 34 L-Arginin, an Position 87 L-Threonin und an Position 203 L-Prolin. Es ist bekannt, dass durch wirtseigene Enzyme, sogenannte Aminopeptidasen, das endständige Methionin bei der Proteinsynthese entfernt werden kann. In der SEQ ID NO:3

30 sind stromaufwärts (upstream) und stromabwärts (downstream) gelegene Nukleotidsequenzen zusätzlich angegeben.

In der SEQ ID NO: 10 ist die Nukleotidsequenz der Kodierregion des amtR-Gens von *Corynebacterium efficiens* Stamm YS-314 gemäß der Angaben der Datenbank des National

35 Center for Biotechnology Information (NCBI) wiedergegeben. SEQ ID NO:11 zeigt die Aminosäuresequenz des kodierten Polypeptids.

In der SEQ ID NO: 20 ist die Nukleotidsequenz der Kodierregion des amtR-Gens von *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 wiedergegeben. Die Sequenz wurde vom Anmelder bestimmt. SEQ ID NO:21 zeigt die Aminosäuresequenz des
5 kodierten Polypeptids. Die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 21 enthält an Position 34 L-Histidin, an Position 87 L-Isoleucin und an Position 203 L-Serin.

Die Nukleotidsequenz des Genoms von *Corynebacterium glutamicum* wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen bestimmt.

10 Die von Kalinowski et al. (Journal of Biotechnology 104(1-3), 5-25 (2003)) von der Universität Bielefeld (Deutschland) bestimmte Sequenz von Stamm ATCC13032 ist unter der Zugangsnummer NC_006985 verfügbar. Dem amtR-Gen wird dort die Bezeichnung cg0986 zugeordnet und umfasst die
15 Region von Position 923864-924532 des komplementären Stranges.

Die von Ikeda und Nakagawa (Applied Microbiology 62(2-3), 99-109 (2003)) von der Kitasato Universität (Japan) bestimmte Sequenz von Stamm ATCC13032 ist unter der
20 Zugangsnummer NC_003450 verfügbar. Dem amtR-Gen wird dort die Bezeichnung NCgl0828 zugeordnet.

Die von Yukawa et al. (Microbiology 153(Pt 4),1042-58 (2007)) vom Research Institute of Innovative Technology for the Earth (RITE) (Japan) bestimmte Sequenz von Stamm R ist
25 unter der Zugangsnummer NC_009342 verfügbar. Dem amtR-Gen wird dort die Bezeichnung cgR_0978 zugeordnet.

Die Nukleotidsequenz des Genoms von *Corynebacterium efficiens* wurde von Nishio et al. (Genome Research 2003 13(7), 1572-1579 (2003)) von der Firma Ajinomoto (Japan)
30 bestimmt. Sie ist unter der Zugangsnummer NC_004369 verfügbar. Dem amtR-Gen wird dort die Bezeichnung COG1309K zugeordnet und umfasst die Region von Position 1002436-1003107 des komplementären Stranges.

Der AmtR-Regulator gehört zur TetR-Familie der
35 Transkriptionsregulatoren und weist wie die anderen

Mitglieder dieser Familie an der DNA-Bindestelle ein typisches Helix-Turn-Helix Motiv auf (Ramos et al., Microbiology and Molecular Biology Reviews 69(2): 326-356 (2003); Jacoby et al., Molecular Microbiology 37(4): 964-977 (2000)).

Die Nukleotidsequenzen der DNA, an die der AmtR-Regulator bindet, sind bekannt. Von Jakoby et al. (Molecular Microbiology 37(4), 964-977 (2000)) wurde mittels Deletionsanalysen, Verzögerungsgelelektrophorese (gel retardation assay) und dem Matchmaker One-Hybrid-System (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, USA) die Expression des amt-Gens, das für den Ammonium-Transporter Amt in Corynebacterium glutamicum (Siewe et al., Journal of Biological Chemistry 271 (10): 5398-5402 (1996)) kodiert, untersucht. Der Ammonium-Transporter Amt wird bei Jakoby et al. auch als „(methyl)ammonium uptake system“ bezeichnet. Bei Beckers et al. (Molecular Microbiology 58(2), 580-595 (2005)) wird das amt-Gen als amtA-Gen bezeichnet. Es trägt die NCBI Zugangsnummer NCgl1521. Von Jakoby et al. wurde gezeigt, dass die Expression des amt-Gens durch Bindung des AmtR-Regulators an Bindemotive doppelsträngiger DNA mit der Nukleotidsequenz 5'-ATCTATAGAACGATAG-3' und 5'-ATCTATAGGCGGATAG-3' reprimiert wird.

Von Beckers et al. (Molecular Microbiology 58(2), 580-595 (2005)) wurde das Konsensus Motiv (consensus motif) der Bindestelle für die vom AmtR-Regulator regulierten Gene bestimmt. Beckers et al. geben im Gegensatz zu Jakoby et al. (Molecular Microbiology 37(4), 964-977 (2000)) die Nukleotidsequenz des revers komplementären DNA-Stranges der Bindestelle an.

Weitere Ausführungen zum AmtR-Regulator findet man unter anderem bei Walter et al. (Journal of Molecular Microbiology 12, 131-138 (2007)) und A. Burkovski (Archives of Microbiology 179: 83-88 (2003); Aufsatz „Nitrogen Metabolism and its Regulation“ im „Handbook of Corynebacterium glutamicum“ (Eds.: L. Eggeling und M. Bott, CRC Press, Taylor & Francis, 2005)).

Der Begriff „Abschwächung“ beinhaltet die Verringerung der intrazellulären Konzentration oder Aktivität eines oder mehrerer Polypeptide (Proteine) bzw. Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, im Vergleich zum Elternstamm. Als Elternstamm oder Ausgangsstamm wird der Stamm bezeichnet, an dem die Maßnahmen der Abschwächung durchgeführt wurden. Die Abschwächung kann erzielt werden, indem die Expression eines Polypeptids, beispielsweise durch Verwendung eines schwachen Promotors, verringert wird oder indem ein Allel verwendet wird, das für ein Polypeptid mit einer niedrigeren Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen inaktiviert.

Die Promotorregion des amtR-Gens ist in SEQ ID NO:5 dargestellt. Die Nukleotidsequenz von SEQ ID NO:5 ist in SEQ ID NO:3 enthalten. Position 1 von SEQ ID NO:5 entspricht Position 911 von SEQ ID NO:3. Position 90 von SEQ ID NO:5 entspricht Position 1000 von SEQ ID NO:3.

Erfindungsgemäß wird durch eine oder mehrere der Modifikationen der Promotorregion des amtR-Gens ausgewählt aus der Gruppe

- a. Substitution der Nukleobase Guanin an Position 7 der Promotorregion des amtR-Gens gemäß SEQ ID NO:5 durch Thymin,
- 25 b. Substitution der Nukleobase Cytosin an Position 11 der Promotorregion des amtR-Gens gemäß SEQ ID NO:5 durch Guanin,
- c. Substitution der Nukleobase Thymin an Position 40 von SEQ ID NO:5 durch Guanin,
- 30 d. Substitution der Nukleobase Thymin an Position 45 der Promotorregion des amtR-Gens gemäß SEQ ID NO:5 durch Guanin,
- e. Deletion einer oder mehrerer der Nukleobasen von Position 40 bis 45, bevorzugt Deletion sämtlicher

Nukleobasen von Position 40 bis 45, der Promotorregion des amtR-Gens gemäß SEQ ID NO:5,

- 5 f. Deletion einer oder mehrerer der Nukleobasen zwischen Position 72 und 78 der Promotorregion des amtR-Gens gemäß SEQ ID NO:5, und
- g. Substitution einer mehrerer der Nukleobasen Adenin oder Guanin zwischen Position 72 und 78 der Promotorregion des amtR-Gens gemäß SEQ ID NO:5 gegen Thymin oder Cytosin,
- 10 die Expression des AmtR-Regulators verringert.

Erfindungsgemäß wird weiterhin durch Austausch des ATG Startkodons an Position 1 bis 3 der Kodierregion des amtR-Gens gegen ein GTG oder TTG Startkodon die Expression des AmtR-Regulators verringert.

- 15 Durch die Verringerung der Expression des amtR-Gens wird die intrazelluläre Konzentration des AmtR-Regulators auf $>0\%$ bis $\leq 75\%$, $>0\%$ bis $\leq 50\%$, $>0\%$ bis $\leq 25\%$, $>0\%$ bis $\leq 5\%$, $>0\%$ bis $\leq 1\%$, oder auf $\geq 0,1\%$ bis $\leq 75\%$, $\geq 0,1\%$ bis $\leq 50\%$, $\geq 0,1\%$ bis $\leq 25\%$, $\geq 0,1\%$ bis $\leq 5\%$, $\geq 0,1\%$ bis $\leq 1\%$, oder auf $\geq 1\%$ bis $\leq 75\%$, $\geq 1\%$ bis $\leq 50\%$, $\geq 1\%$ bis $\leq 25\%$, $\geq 1\%$ bis $\leq 5\%$, oder auf $\geq 5\%$ bis $\leq 75\%$, $\geq 5\%$ bis $\leq 50\%$, $\geq 5\%$ bis $\leq 25\%$ der Konzentration im Elternstamm bzw. Ausgangsstamm herabgesetzt.

- 25 Erfindungsgemäß wird schließlich durch einen oder mehrere, bevorzugt maximal 3, besonders bevorzugt maximal 2, der Aminosäureaustausche ausgewählt aus der Gruppe

- a. Austausch des Glycin an Position 3 der Aminosäuresequenz, bevorzugt der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:21 oder SEQ ID NO:11, gegen eine andere proteinogene L-Aminosäure, bevorzugt L-Glutaminsäure oder L-Asparaginsäure, ganz besonders bevorzugt L-Glutaminsäure,
- 30 b. Austausch des L-Isoleucin an Position 24 der Aminosäuresequenz, bevorzugt der Aminosäuresequenz

gemäß SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:21 oder SEQ ID NO:11, gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Glutamin, L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure, bevorzugt L-Asparaginsäure,

- 5 c. Austausch des L-Leucin an Position 31 der Aminosäuresequenz, bevorzugt der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:21 oder SEQ ID NO:11, gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-Prolin, L-Asparagin, L-Glutamin, L-Phenylalanin, L-Tyrosin, L-Tryptophan, L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure, bevorzugt L-Prolin,
- 10
- d. Austausch des L-Phenylalanin an Position 32 der Aminosäuresequenz, bevorzugt der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:21 oder SEQ ID NO:11, gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Glycin, L-Glutaminsäure, L-Asparaginsäure, L-Prolin und L-Cystein, bevorzugt L-Prolin,
- 15
- e. Austausch des Glycin an Position 36 der Aminosäuresequenz, bevorzugt der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:21 oder SEQ ID NO:11, gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-Glutaminsäure, L-Asparaginsäure, L-Isoleucin, L-Histidin und L-Phenylalanin, bevorzugt L-Histidin, L-Glutaminsäure, oder L-Asparaginsäure, ganz besonders bevorzugt L-Asparaginsäure,
- 20
- 25
- f. Austausch des L-Threonin an Position 42 der Aminosäuresequenz, bevorzugt der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:21 oder SEQ ID NO:11, gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-Prolin, L-Isoleucin, L-Methionin, L-Glutamin, L-Tryptophan, L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure, bevorzugt L-Glutaminsäure,
- 30
- g. Austausch des Glycin an Position 50 der Aminosäuresequenz, bevorzugt der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:21 oder SEQ ID NO:11, gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-
- 35

Glutaminsäure, L-Asparaginsäure, L-Isoleucin, L-Histidin, L-Tryptophan und L-Phenylalanin, bevorzugt L-Tryptophan,

- 5 h. Austausch des L-Glutamin an Position 53 der Aminosäuresequenz, bevorzugt der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:21 oder SEQ ID NO:11, gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-Cystein, L-Methionin, L-Tyrosin, L-Tryptophan und L-Phenylalanin, bevorzugt L-Phenylalanin,
- 10 i. Austausch des L-Alanin an Position 54 der Aminosäuresequenz, bevorzugt der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:21 oder SEQ ID NO:11, gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-Phenylalanin, L-Isoleucin, L-Tryptophan, L-Tyrosin, L-15 Histidin, L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure, bevorzugt L-Histidin,
- j. Austausch des L-Serin an Position 55 der Aminosäuresequenz, bevorzugt der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:21 oder SEQ ID NO:11, gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-20 Prolin, L-Phenylalanin, L-Tryptophan, L-Lysin, L-Arginin, L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure, bevorzugt L-Phenylalanin,
- k. Austausch des L-Tyrosin an Position 57 der Aminosäuresequenz, bevorzugt der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:21 oder SEQ ID NO:11, gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-25 Prolin, Glycin, L-Methionin, L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure, bevorzugt L-Asparaginsäure,
- 30 l. Austausch des L-Tyrosin an Position 58 der Aminosäuresequenz, bevorzugt der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:21 oder SEQ ID NO:11, gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-Prolin, L-Methionin und L-Cystein, bevorzugt L-Prolin,

- m. Austausch des L-Histidin an Position 59 der Aminosäuresequenz, bevorzugt der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:11, gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-Lysin, L-Asparaginsäure, L-Isoleucin, L-Prolin und Glycin, bevorzugt L-Prolin, und
- n. Austausch des L-Lysin an Position 63 der Aminosäuresequenz, bevorzugt der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:21 oder SEQ ID NO:11, gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-Alanin, L-Glutaminsäure, L-Asparaginsäure, L-Asparagin, L-Tyrosin und L-Tryptophan, bevorzugt L-Asparagin

die Aktivität des AmtR-Regulators verringert. Bevorzugt wird der Austausch des Glycin an Position 3 der Aminosäuresequenz und der Austausch des Glycin an Position 36 der Aminosäuresequenz.

Durch die erfindungsgemäßen Aminosäureaustausche wird die Aktivität des AmtR-Regulators auf $> 0\%$ bis $\leq 75\%$, $> 0\%$ bis $\leq 50\%$, $> 0\%$ bis $\leq 25\%$, $> 0\%$ bis $\leq 5\%$, $> 0\%$ bis $\leq 1\%$, oder auf $\geq 0,1\%$ bis $\leq 75\%$, $\geq 0,1\%$ bis $\leq 50\%$, $\geq 0,1\%$ bis $\leq 25\%$, $\geq 0,1\%$ bis $\leq 5\%$, $\geq 0,1\%$ bis $\leq 1\%$, oder auf $\geq 1\%$ bis $\leq 75\%$, $\geq 1\%$ bis $\leq 50\%$, $\geq 1\%$ bis $\leq 25\%$, $\geq 1\%$ bis $\leq 5\%$ oder auf $\geq 5\%$ bis $\leq 75\%$, $\geq 5\%$ bis $\leq 50\%$, $\geq 5\%$ bis $\leq 25\%$ der Aktivität des AmtR-Regulators des Wildtyps, bevorzugt mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:11 verringert.

Darüberhinaus ist es erfindungsgemäß möglich die Expression der erfindungsgemäßen Varianten des AmtR-Regulators durch Verwendung bekannter, schwacher Promotoren abzusenken bzw. einzustellen. Hierzu gehören unter anderem die Promotoren seqP-RBS_01 to seqP-RBS_07, die in der Zeitschrift Research Disclosure unter der Nummer 512057 (Ausgabe Dezember 2006) offengelegt sind und die von M. Patek beschriebenen Varianten des dapA-Promotors, bevorzugt die Varianten C7, C13, O1, C2, J2, B31, C5 und B6 (M. Patek im "Handbook of Corynebacterium glutamicum" (Lothar Eggeling and Michael

Bott (editors), CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, USA, 2005)).

Die Abschwächung des amtR-Gens kann mit verschiedenen Methoden bestimmt werden. Die Konzentration ist mit Hilfe von 1- und 2-dimensionaler Proteingelaufftrennung und anschließender Bestimmung der Proteinkonzentration im Gel nachweisbar. Eine gebräuchliche Methode zur Präparation der Proteingele bei coryneformen Bakterien und zur Identifizierung der Proteine ist die von Hermann et al. (Electrophoresis, 22:1712-23 (2001)) beschriebene Vorgehensweise. Die Proteinkonzentration kann weiterhin durch Western-Blot-Hybridisierung mit einem für das nachzuweisende Protein spezifischen Antikörper (Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) und anschließender optischer Auswertung mit entsprechender Software zur Konzentrationsbestimmung (Lohaus und Meyer (1998) Biospektrum 5:32-39; Lottspeich (1999) Angewandte Chemie 111:2630-2647) analysiert werden. Die Aktivität des AmtR-Regulators als DNA-bindendem Protein kann mittels Verzögerungsgelelektrophorese (retardation gel electrophoresis) (Wilson et al. (2001) Journal of Bacteriology 183:2151-2155) gemessen werden. Dieser Test wird auch als „DNA band shift assay“ bezeichnet. Die Wirkung von DNA-bindenden Proteinen auf die Expression der von ihnen kontrollierten Gene kann schließlich auch durch verschiedene, gut beschriebene Methoden des Reporter-Gen-Assays nachgewiesen werden (Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein isoliertes Polynukleotid umfassend die Promotorregion oder im Wesentlichen bestehend aus der Promotorregion des amtR-Gens gemäß SEQ ID NO:5, welche eine oder mehrere der erfindungsgemäßen Modifikationen aufweist.

Bevorzugt umfasst die erfindungsgemäße Promotorregion des amtR-Gens \leq (maximal) 5000, \leq 4000, \leq 3000, \leq 2000, \leq 1000,

≤ 750 , ≤ 500 , ≤ 250 , oder ≤ 100 Nukleobasen bzw. Basenpaare an Nukleotidsequenzen, die die erfindungsgemäße Promotorregion stromaufwärts (upstream) und stromabwärts (downstream) natürlicherweise flankieren.

- 5 Der Begriff „natürlich“ beinhaltet in diesem Zusammenhang auch Nukleotidsequenzen welche die erfindungsgemäßen Mutationen enthalten.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein isoliertes Polynukleotid umfassend die Kodierregion oder im
10 Wesentlichen bestehend aus der Kodierregion des amtR-Gens, welche für ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 oder 21 kodiert, wobei anstelle des ATG Startkodons ein GTG oder TTG Startkodon verwendet wird.

Gegenstand der Erfindung ist schließlich ein isoliertes
15 Polynukleotid kodierend für einen AmtR-Regulator, dessen Aminosäuresequenz zu mindestens 85% oder zu mindestens 90%, bevorzugt zu mindestens 95%, besonders bevorzugt zu mindestens 98% oder zu mindestens 99% und ganz besonders bevorzugt identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ
20 ID NO:2 und im Wesentlichen eine Länge von 222 Aminosäuren, bevorzugt eine Länge von 222 Aminosäuren, umfasst oder besitzt und einen (1) oder mehrere, bevorzugt maximal 3, besonders bevorzugt maximal 2 der erfindungsgemäßen Aminosäureaustausche, das heißt der Aminosäureaustausche an
25 den Positionen 3, 24, 31, 32, 36, 42, 50, 53, 54, 55, 57, 58, 59 und 63, aufweist.

Bevorzugt wird ein isoliertes Polynukleotid, das für einen AmtR-Regulator kodiert, der die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2 umfasst oder besitzt und der einen (1) oder
30 mehrere, bevorzugt maximal 3, besonders bevorzugt maximal 2 der erfindungsgemäßen Aminosäureaustausche, das heißt der Aminosäureaustausche an den Positionen 3, 24, 31, 32, 36, 42, 50, 53, 54, 55, 57, 58, 59 und 63, aufweist.

Gegebenenfalls enthält die Aminosäuresequenz darüber hinaus
35 maximal 3, bevorzugt maximal 2 besonders bevorzugt maximal (einen) konservative(n) Aminosäureaustausch(e).

Bevorzugt wird weiterhin ein isoliertes Polynukleotid, das für einen AmtR-Regulator kodiert, der die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:11 umfasst oder besitzt und der einen (1) oder mehrere, bevorzugt maximal 3, besonders bevorzugt maximal 2 der erfindungsgemäßen Aminosäureaustausche, das heißt der Aminosäureaustausche an den Positionen 3, 24, 31, 32, 36, 42, 50, 53, 54, 55, 57, 58, 59 und 63, aufweist. Gegebenenfalls enthält die Aminosäuresequenz darüber hinaus maximal 3, bevorzugt maximal 2 besonders bevorzugt maximal (einen) konservative(n) Aminosäureaustausch(e).

Bevorzugt wird schließlich ein isoliertes Polynukleotid, das für einen AmtR-Regulator kodiert, der die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:21 umfasst oder besitzt und der einen (1) oder mehrere, bevorzugt maximal 3, besonders bevorzugt maximal 2 der erfindungsgemäßen Aminosäureaustausche, das heißt der Aminosäureaustausche an den Positionen 3, 24, 31, 32, 36, 42, 50, 53, 54, 55, 57, 58, 59 und 63, aufweist. Gegebenenfalls enthält die Aminosäuresequenz bevorzugt maximal (einen) konservative(n) Aminosäureaustausch(e).

Ein Beispiel für einen konservativen Aminosäureaustausch ist der Austausch des Valin an Position 141 der Aminosäuresequenz gegen Isoleucin.

Besonders bevorzugt wird ein isoliertes Polynukleotid, das für einen AmtR-Regulator mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2, kodiert, wobei das Glycin an Position 3 gegen eine andere proteinogene Aminosäure, bevorzugt L-Glutaminsäure oder L-Asparaginsäure, besonders bevorzugt L-Glutaminsäure, ausgetauscht wird. Die Aminosäuresequenz der Variante des AmtR-Polypeptids welche L-Glutaminsäure an Position 3 enthält ist in SEQ ID NO:6 und 8 dargestellt.

Besonders bevorzugt wird weiterhin ein isoliertes Polynukleotid, das für einen AmtR-Regulator mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2, kodiert, wobei das Glycin an Position 36 gegen eine andere proteinogene Aminosäure, bevorzugt L-Histidin, L-Glutaminsäure oder L-

Asparaginsäure, ganz besonders bevorzugt L-Asparaginsäure, ausgetauscht wird.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein isoliertes Polynukleotid, welches die Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID
5 NO:5 oder 7 umfasst oder besitzt.

Gegenstand der Erfindung ist schließlich ein isoliertes Polynukleotid kodierend für mindestens einen Teil der Aminosäuresequenz des AmtR-Polypeptids, der \geq (mindestens) 5, ≥ 10 , ≥ 20 , ≥ 40 , ≥ 80 oder ≥ 100 Aminosäuren umfasst
10 und der mindestens einen erfindungsgemäßen Aminosäureaustausch im AmtR-Polypeptid enthält, wobei die zum erfindungsgemäßen Aminosäureaustausch führende Mutation im Polynukleotid von Nukleotidsequenzen mit einer Länge von \leq (maximal) 5000, ≤ 4000 , ≤ 3000 , ≤ 2000 , ≤ 1000 , ≤ 750 , \leq
15 500, ≤ 250 , oder ≤ 100 Nukleobasen bzw. Basenpaaren stromaufwärts (upstream) und stromabwärts (downstream) flankiert wird, die in coryneformen Bakterien natürlicherweise vorkommt.

So enthält beispielsweise ein Polynukleotid mit der
20 Nukleotidsequenz von Position 500 bis 1510 von SEQ ID NO:8 einen Teil der Kodierregion des amtR-Gens, der für eine Aminosäuresequenz mit einer Länge von 170 Aminosäuren kodiert, wobei diese den erfindungsgemäßen Aminosäureaustausch an Position 3 des AmtR-Polypeptids
25 aufweist, und eine Nukleotidsequenz mit einer Länge von mindestens 500 Nukleobasen stromaufwärts und stromabwärts der zum Aminosäureaustausch führenden Mutation, wie sie natürlicherweise in Corynebacterium glutamicum vorkommt.

Gegenstand der Erfindung sind auch Vektoren, welche die
30 erfindungsgemäßen Polynukleotide enthalten.

Gegenstand der Erfindung sind schließlich auch Zellen von Mikroorganismen, insbesondere von Bakterien, bevorzugt der Gattung Corynebacterium und Escherichia, besonders bevorzugt der Art Corynebacterium glutamicum und
35 Escherichia coli, die die genannten Polynukleotide oder

Vektoren enthalten oder unter Verwendung der genannten Polynukleotide oder Vektoren hergestellt wurden.

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. Anschließend wird aus den Mutanten DNA bereitgestellt, beziehungsweise isoliert und mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primerpaaren, die die Amplifizierung des *amtR*-Gens bzw. *amtR*-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

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 Arbeitsschritt 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, 1067 (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 bzw. amtR-Allel, durch Methoden der in-vitro Genetik herzustellen.

- 10 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
- 15 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.
- 20
- 25
- 30 Die auf diese Weise hergestellten Polynukleotide, können dazu verwendet werden, um rekombinante Stämme der Gattung Corynebacterium, bevorzugt Corynebacterium glutamicum herzustellen, die die erfindungsgemäßen Varianten des AmtR-Regulators enthalten und/oder die erfindungsgemäßen
- 35 Modifikationen im Promotorbereich des amtR-Gens enthalten und die im Vergleich zum Ausgangs- beziehungsweise

Elternstamm in erhöhtem Umfang L-Aminosäuren in das sie umgebende Medium abgeben und/oder im Zellinneren anhäufen.

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 versehenen 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 pK18*mobsacB*, 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.

- 5 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.
- 10 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)) in das *Corynebacterium*
- 15 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
- 20 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.

- 25 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,
- 30 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
- 35 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
5 von *C. glutamicum* einzubauen.

So kann beispielsweise für den Einbau der Mutation, die zum Aminosäureaustausch des Glycins gegen L-Glutaminsäure an Position 3 von SEQ ID NO:2 führt, bevorzugt wie in SEQ ID NO:6 und 8 dargestellt, ein Polynukleotid bzw. DNA-Fragment
10 verwendet werden, das mindestens die Nukleotidsequenz von Position 958 bis 1058 von SEQ ID NO:8 umfasst. Dieses DNA-Fragment enthält die erfindungsgemäße Mutation und stromaufwärts und stromabwärts davon eine Nukleotidsequenz mit einer Länge von jeweils mindestens 50 Nukleobasen.

15 Bevorzugt werden DNA-Fragmente die stromaufwärts und stromabwärts der Mutation eine Nukleotidsequenz mit einer Länge von jeweils mindestens ca. 100, besonders bevorzugt jeweils mindestens ca. 250 Nukleobasen und ganz besonders bevorzugt jeweils mindestens ca. 500 Nukleobasen besitzen.
20 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, ca. 3000, ca. 4000 oder 5000 Nukleobasen. Die Gesamtlänge des für den Allelaustausch eingesetzten Polynukleotids beträgt
25 dementsprechend maximal ca. 1000, maximal ca. 1500, maximal ca. 2000, maximal ca. 3000, maximal ca. 4000, maximal ca. 6000, maximal ca. 8000 oder 10000 Nukleobasen.

Die Leistung der erfindungsgemäßen Bakterien der Gattung *Corynebacterium* bzw. des Fermentationsprozesses unter
30 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
35 (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
5 bzw. den Fermentationsprozess unter Verwendung derselben erhöht.

Die erfindungsgemäß hergestellten Bakterien der Gattung Corynebacterium können kontinuierlich - wie beispielsweise in der WO 05/021772 beschrieben- oder diskontinuierlich im
10 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
15 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,
20 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
25 „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.

30 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,
35 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.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt,
5 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.

10 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
15 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
20 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
25 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 8,5 vorzugsweise 6,5 bis 8 eingestellt. Zur
30 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
35 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 Überdruck von 0,03 bis 5 0,2 MPa, gefahren. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C, besonders bevorzugt bei 30° bis 37°C. Bei batch-Verfahren wird die Kultivierung solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum der gewünschten L-Aminosäure, gebildet 10 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 15 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.

Die Analyse von L-Aminosäuren zur Bestimmung der 20 Konzentration zu einem oder mehreren Zeitpunkt(en) im Verlauf der Fermentation kann durch Trennung der L-Aminosäuren mittels Ionenaustauschchromatographie vorzugsweise Kationenaustauschchromatographie mit anschließender Nachsäulenderivatisierung unter Verwendung 25 von Ninhydrin erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry 30: 1190-1206 (1958)) beschrieben. Anstelle von Ninhydrin kann auch ortho-Phtaldialdehyd zur Nachsäulenderivatisierung eingesetzt werden. Einen 30 Übersichtsartikel zur Ionenaustauschchromatographie findet man bei Pickering (LC·GC (Magazine of Chromatographic Science) 7(6), 484-487 (1989)).

Es ist ebenfalls möglich eine Vorsäulenderivatisierung beispielsweise unter Verwendung von ortho-Phtaldialdehyd oder Phenylisothiocyanat vorzunehmen und die entstandenen 35 Aminosäurederivate durch Reversed-Phase-Chromatographie (RP) vorzugsweise in Form der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) aufzutrennen. Eine derartige Methode

ist beispielsweise bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry 51: 1167-1174 (1979)) beschrieben.

Die Detektion erfolgt photometrisch (Absorption, Fluoreszenz).

- 5 Eine zusammenfassende Darstellung zur Aminosäureanalyse findet man unter anderem im Lehrbuch „Bioanalytik“ von Lottspeich und Zorbas (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland 1998).

- 10 Gegenstand der Erfindung ist dementsprechend auch ein Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, bevorzugt L-Lysin, L-Glutaminsäure, L-Glutamin, L-Arginin, L-Prolin und L-Ornithin, besonders bevorzugt L-Lysin, dadurch gekennzeichnet, dass man folgende Schritte durchführt:

- 15 a) Fermentation der erfindungsgemäßen coryneformen Bakterien, bevorzugt der Gattung Corynebacterium, besonders bevorzugt der Art Corynebacterium glutamicum, in einem geeignetem Nährmedium, und
- b) Akkumulation der L-Aminosäure in dem Nährmedium und/oder in den Zellen der genannten Bakterien.

- 20 Anschließend erfolgt die Bereitstellung bzw. Herstellung oder Gewinnung eines L-Aminosäure haltigen Produktes in flüssiger oder fester Form.

- 25 Durch die Maßnahmen der Fermentation erhält man eine Fermentationsbrühe, welche die gewünschte L-Aminosäure enthält.

- 30 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 L-Aminosäure sicherstellen.

Bei Abschluss der Fermentation enthält die entstandene Fermentationsbrühe dementsprechend

- 5 a) die infolge der Vermehrung der Zellen des Mikroorganismus entstandene Biomasse (Zellmasse) des Mikroorganismus,
- b) die im Laufe der Fermentation gebildete L-Aminosäure,
- c) die im Laufe der Fermentation gebildeten organischen Nebenprodukte, und
- 10 d) die durch die Fermentation nicht verbrauchten Bestandteile des eingesetzten Fermentationsmediums beziehungsweise der Einsatzstoffe wie beispielsweise Vitamine wie Biotin oder Salze wie Magnesiumsulfat.

Zu den organischen Nebenprodukten gehören Stoffe, die von den bei der Fermentation eingesetzten Mikroorganismen neben
15 der jeweiligen L-Aminosäure erzeugt und gegebenenfalls ausgeschieden werden. Hierzu gehören auch Zucker wie zum Beispiel Trehalose.

Die Fermentationsbrühe wird dem Kulturgefäß beziehungsweise dem Fermentationsbehälter entnommen, gegebenenfalls
20 gesammelt, und dazu verwendet, ein L-Aminosäure haltiges Produkt in flüssiger oder fester Form bereitzustellen. Hierfür wird auch der Ausdruck „Gewinnen des L-Aminosäure haltigen Produktes“ verwendet. Im einfachsten Fall stellt die L-Aminosäure-haltige Fermentationsbrühe selbst das
25 gewonnene Produkt dar.

Durch eine oder mehrere der Maßnahmen ausgewählt aus der Gruppe

- 30 a) teilweise ($> 0\%$ bis $< 80\%$) bis vollständige (100%) oder nahezu vollständige ($\geq 80\%$, $\geq 90\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$, $\geq 99\%$) Entfernung des Wassers,
- b) teilweise ($> 0\%$ bis $< 80\%$) bis vollständige (100%) oder nahezu vollständige ($\geq 80\%$, $\geq 90\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$, $\geq 99\%$) Entfernung der Biomasse, wobei

diese gegebenenfalls vor der Entfernung inaktiviert wird,

5 c) teilweise ($> 0\%$ bis $< 80\%$) bis vollständige (100%) oder nahezu vollständige ($\geq 80\%$, $\geq 90\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$, $\geq 99\%$, $\geq 99,3\%$, $\geq 99,7\%$) Entfernung der im Laufe der Fermentation gebildeten organischen Nebenprodukte, und

10 d) teilweise ($> 0\%$) bis vollständige (100%) oder nahezu vollständige ($\geq 80\%$, $\geq 90\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$, $\geq 99\%$, $\geq 99,3\%$, $\geq 99,7\%$) Entfernung der durch die Fermentation nicht verbrauchten Bestandteile des eingesetzten Fermentationsmediums beziehungsweise der Einsatzstoffe,

15 aus der Fermentationsbrühe erzielt man eine Konzentrierung bzw. Reinigung der L-Aminosäure. Auf diese Weise werden Produkte isoliert, die einen gewünschten Gehalt an L-Aminosäure aufweisen.

20 Die teilweise ($> 0\%$ bis $< 80\%$) bis vollständige (100%) oder nahezu vollständige ($\geq 80\%$ bis $< 100\%$) Entfernung des Wassers (Maßnahme a)) wird auch als Trocknung bezeichnet.

Durch vollständige oder nahezu vollständige Entfernung des Wassers, der Biomasse, der organischen Nebenprodukte und der nicht verbrauchten Bestandteile des eingesetzten Fermentationsmediums gelangt man zu reinen (≥ 80 Gew.-%, \geq 25 90 Gew.-%) oder hochreinen (≥ 95 Gew.-%, ≥ 97 Gew.-%, $\geq 99\%$ Gew.-%) Produktformen der L-Aminosäuren. Für die Massnahmen gemäß a), b), c) oder d) sind im Stand der Technik eine Fülle von technischen Anleitungen verfügbar.

30 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 35 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 gegebenenfalls die Biomasse des eingesetzten Mikroorganismus mit einem Anteil von >0% - 100%.

Entsprechend der verschiedenen Produktformen kennt man verschiedenste Verfahren, bei denen aus der Fermentationsbrühe das L-Lysin-haltige Produkt oder das gereinigte L-Lysin hergestellt wird.

Zur Herstellung von festem, reinen L-Lysin werden im wesentlichen Methoden der Ionenaustauschchromatographie gegebenenfalls 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 ($\text{Lys}_2\text{-H}_2\text{SO}_4$).

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
5 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
10 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%,
15 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
20 verbleibt. In einem erfindungsgemäßen Verfahren wird dementsprechend die Biomasse in Anteilen $\geq 0\%$ bis $\leq 100\%$ entfernt.

Schließlich kann die nach der Fermentation erhaltene Fermentationsbrühe vor oder nach der vollständigen oder
25 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
30 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.

35 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
5 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
10 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,
15 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
20 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
25 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.

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

35 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
5 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
10 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
15 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
20 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.

25 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
30 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
35 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

- 5 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:
- 10 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.

15 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.

20 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.

25 Das molare Sulfat/L-Lysin-Verhältnis V wird nach der Formel: $V = 2 \times [\text{SO}_4^{2-}] / [\text{L-Lysin}]$ 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 $\text{Lys}_2\text{-H}_2\text{SO}_4$ 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.

30

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 Futtermittelverarbeitung als Binde-, Gelier-, oder Verdickungsmittel Verwendung
5 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,
10 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
15 genannten Ölen erzielt man eine erhöhte Abriebfestigkeit des Produktes und eine 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
20 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
25 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
30 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 + Mischfüttertechnik 132 (1995)
35 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
5 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
10 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.

15 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
20 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
25 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
30 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,
- 5 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
- 10 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.

- 15 Bei der Herstellung L-Lysin-haltiger Produkte wird das Verhältnis der Ionen bevorzugt so eingestellt, dass das molare Ionenverhältnis entsprechend nachstehender Formel
- $$2x[\text{SO}_4^{2-}] + [\text{Cl}^-] - [\text{NH}_4^+] - [\text{Na}^+] - [\text{K}^+] - 2x[\text{Mg}^{2+}] - 2x[\text{Ca}^{2+}] / [\text{L-Lys}]$$
- 0,68 bis 0,95, bevorzugt 0,68 bis 0,90, besonders bevorzugt
- 20 0,68 bis 0,86 ergibt, so wie von Kushiki et al. in der US 20030152633 beschrieben.

- Im Falle des L-Lysins hat das auf diese Weise hergestellte feste Produkt auf Fermentationsbrühebasis einen Lysingehalt (als Lysinbase) von 10 Gew.-% bis 70 Gew.-% oder 20 Gew.-%
- 25 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.

- 30 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.-%.

Patentansprüche

1. Rekombinantes, L-Aminosäure ausscheidendes,
coryneformes Bakterium bei dem das amtR-Gen, das für
einen AmtR-Regulator kodiert, dessen Aminosäuresequenz
5 mindestens 90% identisch ist mit der Aminosäuresequenz
von SEQ ID NO:2 und im Wesentlichen eine Länge von 222
Aminosäuren umfasst, abgeschwächt worden ist, durch
eine oder mehrere der Maßnahmen ausgewählt aus der
Gruppe
- 10 a) Substitution der Nukleobase Guanin an Position 7
der Promotorregion des amtR-Gens gemäß SEQ ID NO:5
durch Thymin,
- b) Substitution der Nukleobase Cytosin an Position 11
der Promotorregion des amtR-Gens gemäß SEQ ID NO:5
15 durch Guanin,
- c) Substitution der Nukleobase Thymin an Position 40
der Promoterregion des amtR-gen gemäß SEQ ID NO:5
durch Guanin,
- 20 d) Substitution der Nukleobase Thymin an Position 45
der Promotorregion des amtR-Gens gemäß SEQ ID NO:5
durch Guanin,
- e) Deletion einer oder mehrerer der Nukleobasen von
Position 40 bis 45, bevorzugt Deletion sämtlicher
Nukleobasen von Position 40 bis 45, der
25 Promotorregion des amtR-Gens gemäß SEQ ID NO:5,
- f) Deletion einer oder mehrerer der Nukleobasen
zwischen Position 72 und 78 der Promotorregion des
amtR-Gens gemäß SEQ ID NO:5,
- 30 g) Substitution einer oder mehrerer der Nukleobasen Adenin
oder Guanin zwischen Position 72 und 78 der
Promotorregion des amtR-Gens gemäß SEQ ID NO:5
gegen Thymin oder Cytosin,

- h) Austausch des ATG Startkodons an Position 1 bis 3 der Kodierregion des amrR-Gens gegen ein GTG oder TTG Startkodon,
- 5 i) Austausch des Glycin an Position 3 der Aminosäuresequenz gegen eine andere proteinogene L-Aminosäure,
- 10 j) Austausch des L-Isoleucin an Position 24 der Aminosäuresequenz gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Glutamin, L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure, bevorzugt L-Asparaginsäure,
- 15 k) Austausch des L-Leucin an Position 31 der Aminosäuresequenz gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-Prolin, L-Asparagin, L-Glutamin, L-Phenylalanin, L-Tyrosin, L-Tryptophan, L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure, bevorzugt L-Prolin,
- 20 l) Austausch des L-Phenylalanin an Position 32 der Aminosäuresequenz gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Glycin, L-Glutaminsäure, L-Asparaginsäure, L-Prolin und L-Cystein, bevorzugt L-Prolin,
- 25 m) Austausch des Glycin an Position 36 der Aminosäuresequenz gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-Glutaminsäure, L-Asparaginsäure, L-Isoleucin, L-Histidin und L-Phenylalanin, bevorzugt L-Histidin, L-Glutaminsäure oder L-Asparaginsäure,
- 30 n) Austausch des L-Threonin an Position 42 der Aminosäuresequenz gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-Prolin, L-Isoleucin, L-Methionin, L-Glutamin, L-Tryptophan, L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure, bevorzugt L-Glutaminsäure,
- 35 o) Austausch des Glycin an Position 50 der Aminosäuresequenz gegen eine Aminosäure ausgewählt

aus der Gruppe L-Glutaminsäure, L-Asparaginsäure, L-Isoleucin, L-Histidin, L-Tryptophan und L-Phenylalanin, bevorzugt L-Tryptophan,

- 5 p) Austausch des L-Glutamin an Position 53 der Aminosäuresequenz gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-Cystein, L-Methionin, L-Tyrosin, L-Tryptophan und L-Phenylalanin, bevorzugt L-Phenylalanin,
- 10 q) Austausch des L-Alanin an Position 54 der Aminosäuresequenz gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-Phenylalanin, L-Isoleucin, L-Tryptophan, L-Tyrosin, L-Histidin, L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure, bevorzugt L-Histidin,
- 15 r) Austausch des L-Serin an Position 55 der Aminosäuresequenz gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-Prolin, L-Phenylalanin, L-Tryptophan, L-Lysin, L-Arginin, L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure, bevorzugt L-Phenylalanin,
- 20 s) Austausch des L-Tyrosin an Position 57 der Aminosäuresequenz gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-Prolin, Glycin, L-Methionin, L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure, bevorzugt L-Asparaginsäure,
- 25 t) Austausch des L-Tyrosin an Position 58 der Aminosäuresequenz gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-Prolin, L-Methionin und L-Cystein, bevorzugt L-Prolin,
- 30 u) Austausch des L-Histidin an Position 59 der Aminosäuresequenz gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-Lysin, L-Asparaginsäure, L-Isoleucin, L-Prolin und Glycin, bevorzugt L-Prolin, und
- 35 v) Austausch des L-Lysin an Position 63 der Aminosäuresequenz gegen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe L-Alanin, L-Glutaminsäure, L-

Asparaginsäure, L-Asparagin, L-Tyrosin und L-Tryptophan, bevorzugt L-Asparagin.

2. Bakterium gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Aminosäuresequenz des AmtR-Regulators eine Länge von 222 oder 223 Aminosäuren umfasst.
3. Bakterium gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Aminosäuresequenz des AmtR-Regulators die Sequenz von SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:21 oder SEQ ID NO:11 umfasst.
4. Bakterium gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Abschwächung durch eine oder mehrere der Maßnahmen von Anspruch 1 a) bis 1 g) erzielt wird, oder durch die Maßnahmen von Anspruch 1 h) erzielt wird, oder durch eine oder mehrere der Maßnahmen von Anspruch 1 i) bis 1 v).
5. Bakterium gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Abschwächung durch die Maßnahme von Anspruch 1 i) oder Anspruch 1 m) erzielt wird.
6. Bakterium gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Glycin an Position 3 gegen L-Glutaminsäure oder L-Asparaginsäure, bevorzugt gegen L-Glutaminsäure ausgetauscht wird.
7. Bakterium gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Austausch des Glycin an Position 3 von SEQ ID NO:2 gegen L-Glutaminsäure durch den Austausch der Nukleobase Guanin an Position 8 von SEQ ID NO:1 gegen Adenin erzielt wird.
8. Bakterium gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das L-Aminosäure ausscheidendem Bakterium L-Lysin, L-Glutaminsäure,

L-Glutamin, L-Arginin, L-Prolin oder L-Ornithin, bevorzugt

L-Lysin ausscheidet.

- 5 9. Bakterium gemäß Anspruche 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Bakterium im Falle eines L-Lysin ausscheidenden Bakteriums ein Polynukleotid enthält, das für ein Polypeptid mit Aspartatkinase-Aktivität kodiert, welche im Vergleich zum Wildtyp gegenüber der Hemmung durch Lysin und Threonin
- 10 desensibilisiert ist.
10. Bakterium gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Polynukleotid, das für ein Polypeptid mit Aspartatkinase-Aktivität kodiert, überexprimiert wird.
- 15 11. Bakterium gemäß einem der Ansprüche 8-10, dadurch gekennzeichnet, dass das Bakterium im Falle eines L-Lysin ausscheidenden Bakteriums zusätzlich eines oder mehrere der Merkmale ausgewählt aus der folgenden Gruppe besitzt:
- 20 a) überexprimiertes Polynukleotid, das für eine Dihydrodipicolinat-Synthase (DapA) kodiert,
- b) überexprimiertes Polynukleotid, das für eine Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase (Asd) kodiert,
- 25 c) überexprimiertes Polynukleotid, das für eine meso-Diaminopimelat-Dehydrogenase (Ddh) kodiert,
- d) überexprimiertes Polynukleotid, das für eine Diaminopimelat-Decarboxylase (LysA) kodiert,
- e) überexprimiertes Polynukleotid, das für eine Aspartat-Aminotransferase (Aat) kodiert,
- 30 f) überexprimiertes Polynukleotid, das für ein Polypeptid mit L-Lysin-Export Aktivität (LysE) kodiert,

- g) überexprimiertes Polynukleotid, das für eine Pyruvat-Carboxylase (Pyc) kodiert, und
- h) überexprimiertes Polynukleotid, das für eine Dihydrodipicolinat-Reduktase (DapB) kodiert.
- 5 12. Bakterium gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem coryneformen Bakterium um ein Bakterium der Gattung Corynebacterium, bevorzugt
- um ein Bakterium der Art Corynebacterium glutamicum
- 10 handelt.
13. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, dadurch gekennzeichnet, dass man folgende Schritte durchführt,
- a) Fermentation eines Bakteriums gemäß einem der
- 15 Ansprüche 1 bis 12 in einem Nährmedium, und
- b) Akkumulation der L- Aminosäure in dem Nährmedium und/oder in den Zellen der genannten Bakterien.
14. Verfahren nach Anspruch 13 dadurch gekennzeichnet, dass es sich um ein Verfahren ausgewählt aus der
- 20 Gruppe Satzverfahren, Zulaufverfahren und kontinuierliches Verfahren handelt.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 oder 14 dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der L-Aminosäure um L-Lysin handelt.
- 25 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 - 15, dadurch gekennzeichnet, dass man ein L-Aminosäure haltiges Produkt gewinnt.
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass man die L-Aminosäure reinigt oder,
- 30 dass Bestandteile der Fermentationsbrühe und/oder Biomasse in ihrer Gesamtheit oder in Anteilen (> 0 bis 100%) im Produkt verbleiben.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 16,
dadurch gekennzeichnet, dass man einer L-Lysin
haltigen Fermentationsbrühe Wasser entzieht und ein
Produkt mit einem Wassergehalt von maximal 5 Gew.-%
erhält oder,
5 dass man eine L-Lysin haltige Fermentationsbrühe
zunächst konzentriert und anschließend sprühtrocknet
oder sprühgranuliert.
19. Isoliertes Polynukleotid umfassend die
10 Promotorregion des amtR-Gens gemäß SEQ ID NO:5,
welche eine oder mehrere Modifikationen aufweist.
20. Isoliertes Polynukleotid umfassend die Kodierregion
des amtR-Gens, welche für ein Polypeptid mit der
Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:21
15 oder SEQ ID NO:11 kodiert, wobei anstelle des ATG
Startkodons im Polynukleotid ein GTG oder TTG
Startkodon verwendet wird.
21. Isoliertes Polynukleotid kodierend für einen AmtR-
Regulator, dessen Aminosäuresequenz zu mindestens
20 85% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ
ID NO:2 und im Wesentlichen eine Länge von 222
Aminosäuren umfasst und einen oder mehrere,
Aminosäureaustausche an den Positionen 3, 24, 31,
32, 36, 42, 50, 53, 54, 55, 57, 58, 59 und 63, oder
25 den entsprechenden Positionen aufweist.
22. Vektor enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem
oder mehreren der Ansprüche 19 bis 21.
23. Eine Mikroorganismen-Zelle enthaltend den Vektor
gemäß Anspruch 22 oder ein Polynukleotid gemäß
30 einem oder mehreren der Ansprüche 19 bis 21.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/056046

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C12P13/04	C12P13/08	C07K14/35 C12N15/31 C12N15/77
ADD. C12R1/15		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12P C12N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, FSTA, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 460 128 A (AJINMOTO CO INC [JP]) 22 September 2004 (2004-09-22) paragraphs [0013], [0104], [0106], [0109]	1-23
A	BECKERS GABRIELE ET AL: "Regulation of Amr-controlled gene expression in Corynebacterium glutamicum: mechanism and characterization of the Amr regulon." MOLECULAR MICROBIOLOGY OCT 2005, vol. 58, no. 2, October 2005 (2005-10), pages 580-595, XP002539889 ISSN: 0950-382X	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 4 August 2009		Date of mailing of the international search report 13/08/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer van Voorst, Frank

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/056046

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1460128	A	22-09-2004	
		CN 1550546 A	01-12-2004
		KR 20040078588 A	10-09-2004
		US 2005014236 A1	20-01-2005

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2009/056046

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES		
INV. C12P13/04	C12P13/08	C07K14/35 C12N15/31 C12N15/77
ADD. C12R1/15		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)		
C12P C12N C07K		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, FSTA, Sequence Search		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 1 460 128 A (AJINMOTO CO INC [JP]) 22. September 2004 (2004-09-22) Absätze [0013], [0104], [0106], [0109]	1-23
A	BECKERS GABRIELE ET AL: "Regulation of AmrR-controlled gene expression in Corynebacterium glutamicum: mechanism and characterization of the AmrR regulon." MOLECULAR MICROBIOLOGY OCT 2005, Bd. 58, Nr. 2, Oktober 2005 (2005-10), Seiten 580-595, XP002539889 ISSN: 0950-382X	
<input type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
<ul style="list-style-type: none"> * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist 		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
4. August 2009		13/08/2009
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter van Voorst, Frank

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2009/056046

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 1460128	A 22-09-2004	CN 1550546 A	01-12-2004
		KR 20040078588 A	10-09-2004
		US 2005014236 A1	20-01-2005
