

Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Ornithin

Stand der Technik

L-Ornithin ist bekannt für seine stimulierende Wirkung für die Leberfunktion und wird häufig als ein Bestandteil von
5 Medikamenten und in der Sporternährung genutzt.

L-Ornithin wird heute über verschiedene Verfahren hergestellt. Eine Methode ist die fermentative Herstellung mit Hilfe von Mikroorganismen. Eine weitere Methode ist die alkalische Hydrolyse von Arginin, z.B. mit Bariumhydroxid
10 (CN 1594282 A). Eine weitere Methode ist die Biotransformation von Arginin durch immobilisierte Mikroorganismen, die eine Arginaseaktivität besitzen (KR589121B1). In der Patentliteratur ist ferner eine Methode zur Herstellung von L-Ornithin aus L-Citrullin
15 beschrieben (JP 42007767 B4).

In der Literatur sind Mikroorganismen beschrieben, die sich dadurch auszeichnen, dass sie L-Ornithin ins Kulturmedium ausscheiden. Bei den Mikroorganismen handelt es sich z.B. um Bakterien der Gattung Corynebacterium, Brevibacterium,
20 Bacillus (JP 43010996 B4, JP 57041912 B), Escherichia (US 3668072 A), Providencia (JP 03195494) oder Arthrobacter (US 3574061).

L-Ornithin produzierende Mikroorganismen zeichnen sich häufig dadurch aus, dass sie auxotroph für die Aminosäuren
25 L-Arginin oder L-Citrullin sind (beschrieben für Brevibacterium, Bacillus, Corynebacterium in EP392708B1 und KR161147B1 und für Escherichia in US366072A). Weiterhin sind Mikroorganismen beschrieben die eine Resistenz gegenüber 2-Thiazole-Alanin, Sulfaguanidin oder 2-Fluor-
30 Pyruvat besitzen (Japanische Offenlegungsschrift No 61-119194). In EP0393708B1 sind L-Ornithin Produzenten beschrieben, die sich durch eine geringere Resistenz gegenüber Ornithol und Mycophenolsäure auszeichnen. Die genannten Eigenschaften können auch miteinander kombiniert
35 vorliegen.

- Basische Aminosäuren wie L-Lysin, L-Arginin und L-Ornithin gelangen sehr schlecht per passiver Diffusion aus der Zelle (Bellmann et al. (Microbiology 2001; 147:1765-74)). Dies ist gut am Beispiel des Lysins beschrieben. Von Vrlijc et al. (Journal of Bacteriology 1995; 177(14):4021-7) wurden mehrere Export-defiziente Mutanten von *Corynebacterium glutamicum* untersucht. Bei einer Mutante wurde eine intrazelluläre Konzentration von 174 mM L-Lysin gemessen, während extrazellulär nur 0.7 mM gemessen werden konnten.
- 10 Von Vrlijc et al. (Molecular Microbiology 1996; 22(5):815-26 und Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 1999; 1:327-336) und in EP0868527B1 wurde ein neuartiger Exporter als L-Lysinexporter (LysE) identifiziert und beschrieben. Eine definierte LysE-Nullmutante war nicht
- 15 mehr in der Lage L-Lysin aus der Zelle zu transportieren. Das vom *lysE*-Gen kodierte Polypeptid hat eine Länge von 233 Aminosäuren bzw. Aminosäureresten und ist in SEQ ID NO:2 wiedergegeben. Nach Überexpression des *lysE*-Gens in einem Lysinproduzenten wurde eine erhöhte Ausscheidung von L-
- 20 Lysin verzeichnet.
- Von Bellmann et al. (Microbiology 2001; 147:1765-74) wurde der Exporter LysE hinsichtlich des Transports verschiedener basischer Aminosäuren in *C. glutamicum* näher charakterisiert. Die Autoren zeigten, dass der Transporter
- 25 spezifisch die Aminosäuren L-Lysin und L-Arginin aus der Zelle exportiert. Weiterhin gingen die Autoren der Frage nach, ob LysE auch L-Ornithin aus der Zelle exportiert. Dazu wurde zunächst ein als ATCC13032::argF bezeichneter, L-Arginin auxotropher *C. glutamicum* Stamm hergestellt.
- 30 Der Stamm wurde in 50 ml (batch-Kultur) eines als CGXII bezeichneten Minimalmediums kultiviert, welches 40 g/l Glucose enthielt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden 60 mM L-Ornithin, entsprechend 7,9 g/l, gemessen. Intrazellulär wurde in den Zellen des Stammes während einer
- 35 Inkubationszeit von ca. 70 Minuten eine L-Ornithin Konzentration von ca. 200 mM gemessen. Um die Frage zu

klären, ob LysE auch L-Ornithin aus der Zelle transportiert, wurde der Stamm 13032::argF mit dem replikativen Plasmid pEC7lysE transformiert. Durch diese Maßnahme sollte der Stamm eine erhöhte LysE-Aktivität erhalten und dadurch L-Ornithin mit einer höheren Exportrate ins Medium transportieren. Die L-Ornithin Exportrate wurde durch diese Maßnahme jedoch nicht erhöht. Sowohl beim Kontrollstamm (13032::argF) als auch in der Transformante (13032::argF enthaltend pEC7lysE) wurde dieselbe Exportrate ($0,6 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Trockengewicht})^{-1}$) bestimmt. Die Autoren schlossen daraus, dass L-Ornithin nicht durch den Exporter LysE exportiert wird. Sie folgerten weiterhin, dass es eine weitere, unbekannte Exportfunktion (Exportprotein) für L-Ornithin in *Corynebacterium glutamicum* geben muss (Bellmann et al., 2001, S. 1771, Fig.5b) bzw. S.1772 Z.21-28).

In *C. glutamicum* R wurde eine LysE-Variante (Siehe SEQ ID NO:4) identifiziert, die sich von der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz des LysE-Exporters von Stamm ATCC 13032 durch einen um drei Aminosäurereste verlängerten N-Terminus unterscheidet. Bei den Aminosäureresten handelt es sich um die Abfolge Methionin, Valin, Isoleucin (MVI). Dieses LysE Polypeptid von Stamm R wurde in EP1266966B1 als Variante beschrieben, die sich vom Wildtypprotein in der Ausbildung einer Schleifenregion unterscheidet bzw. diese Schleife nicht mehr ausbilden kann und daher einen verbesserten Export von L-Lysin und L-Arginin bewerkstelligen kann.

Eine weitere Variante von LysE wurde von Gunji und Yasueda (Journal of Biotechnology 127, 2006, 1-13) beschrieben. Die Autoren waren an der L-Lysinbildung des obligat methylophilen Bakteriums *Methylophilus methylotrophus* interessiert. Sie transformierten *M. methylotrophus* mit einem als pSE bezeichnetem Plasmid, welches das lysE-Gen aus *C. glutamicum* ATCC13869 enthielt, um die Lysinbildung von *M. methylotrophus* zu verbessern. Die Autoren fanden allerdings, dass sich nur eine mutierte Form des lysE-Gens

(lysE24) stabil in *M. methylotrophus* etablieren ließ. Der offene Leseraster des lysE-Gens ist im lysE24-Allel durch die Insertion eines Thyminrestes verschoben, so dass es zu einem Leserasterabbruch nach 432 bp kommt. Der verkürzte Leseraster kodiert für ein gegenüber dem wildtypischen LysE-Protein von *C. glutamicum* ATCC13869 um 92 AS-Reste C-terminal verkürztes LysE-Protein. Es hat eine Länge von 141 Aminosäureresten. Die letzten 6 C-terminalen Aminosäuren des verkürzten Proteins (Reste 135-141) unterscheiden sich außerdem von den Aminosäuren der wildtypischen LysE-Aminosäuresequenz. Ein *M. methylotrophus* Stamm, der das veränderte LysE-Allel auf einem Plasmid trug (pSE24) wurde auf Lysinbildung geprüft. Hierzu wurde der Stamm für 50 Stunden in 0,3 l eines als SEIIc bezeichneten Minimalmediums in Form einer fed-batch Kultur getestet. Die Autoren fanden, dass die Transformante neben 0,55 mM L-Lysin und 0,19 mM L-Arginin auch geringe Mengen (0,07 mM entsprechend 11,8 mg/l) an L-Ornithin bildete. Die Autoren erklären dies mit einer entweder veränderten Substratspezifität des mutierten Transporters oder führen den veränderten intrazellulären L-Arginin-Pool des Stammes als mögliche Erklärung für die beobachtete L-Ornithin Bildung an. Im Patent EP1266966B1 (Erfinder Gunji und Yasueda) wird die positive Wirkung des LysE24 Transporters auf die L-Lysin und L-Argininausscheidung beschrieben.

Aufgabe der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist die Bereitstellung eines neuen Verfahrens zur fermentativen Herstellung von L-Ornithin.

Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von L-Ornithin, dadurch gekennzeichnet, dass man folgende Schritte durchführt:

- a) Fermentation eines L-Ornithin ausscheidenden Bakteriums, ausgewählt aus der Gruppe *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Arthrobacter* und der

- 5 Enterobacteriaceae, in dem ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, welches die Aktivität eines L-Ornithin-Exporters hat und dessen Aminosäuresequenz zu mindestens ($\geq$) 35%, $\geq$ 40%, $\geq$ 50%, $\geq$ 55%, $\geq$ 60%, $\geq$ 65%,
10 $\geq$ 70%, $\geq$ 75%, $\geq$ 80%, $\geq$ 85%, $\geq$ 90%, $\geq$ 92%, $\geq$ 94%, $\geq$ 96%, $\geq$ 97%, $\geq$ 98%, $\geq$ 99% oder 100%, bevorzugt $\geq$ 70%, besonders bevorzugt $\geq$ 90%, ganz besonders bevorzugt $\geq$ 96% und äußerst bevorzugt 100% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2,
15 überexprimiert vorliegt, in einem Medium
- b) Akkumulation des L-Ornithins in dem Medium, wobei eine Fermentationsbrühe erhalten wird,
- c) wobei für die Überexpression nicht das Plasmid pEC7lysE hinterlegt in DSM23239 verwendet wird,
- 15 d) und wobei gegebenenfalls die Länge des kodierten Polypeptids $\geq$ 146 bis $\leq$ 286 von Aminosäuren bzw. Aminosäureresten beträgt.

Bevorzugt werden Längenbereiche ausgewählt aus der Gruppe $\geq$ 171 bis $\leq$ 286, $\geq$ 196 bis $\leq$ 261, $\geq$ 203 bis $\leq$ 258, $\geq$ 218 bis
20 $\leq$ 243, $\geq$ 228 bis $\leq$ 236, und $\geq$ 228 bis $\leq$ 233 Aminosäuren bzw. Aminosäureresten.

Die Längenbereiche $\geq$ 203 bis $\leq$ 258, $\geq$ 218 bis $\leq$ 243, $\geq$ 228 bis $\leq$ 236 und $\geq$ 228 bis $\leq$ 233 werden besonders bevorzugt und die Längenbereiche $\geq$ 228 bis $\leq$ 236 und $\geq$ 228 bis $\leq$ 233
25 ganz besonders bevorzugt.

Wird im Folgenden L-Ornithin erwähnt, umfasst der Begriff auch dessen Salze wie beispielsweise das L-Ornithin-Monohydrochlorid oder L-Ornithin-Sulfat.

Für ein erfindungsgemäßes Verfahren werden Bakterien,
30 ausgewählt aus der Gruppe Gattung Corynebacterium, Gattung Bacillus, Gattung Streptomyces, Gattung Arthrobacter und der Familie Enterobacteriaceae verwendet.

Innerhalb der Gattung *Corynebacterium* werden Stämme bevorzugt, die auf folgenden Arten beruhen:

Corynebacterium efficiens, wie zum Beispiel der Typstamm DSM44549,

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

Corynebacterium ammoniagenes, wie zum Beispiel der Stamm ATCC6871,

- wobei die Art *Corynebacterium glutamicum* ganz besonders
10 bevorzugt wird.

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

- 15 Stamm ATCC13870, der als *Corynebacterium acetoacidophilum* bezeichnet wurde,

Stamm DSM20137, der als *Corynebacterium lilium* bezeichnet wurde,

Stamm ATCC17965, der als *Corynebacterium melassecola* bezeichnet wurde,

- 20 Stamm ATCC14067, der als *Brevibacterium flavum* bezeichnet wurde,

Stamm ATCC13869, der als *Brevibacterium lactofermentum* bezeichnet wurde, und

- 25 Stamm ATCC14020, der als *Brevibacterium divaricatum* bezeichnet wurde.

- Der Begriff „*Micrococcus glutamicus*“ für *Corynebacterium glutamicum* war ebenfalls gebräuchlich. Einige Vertreter der Art *Corynebacterium efficiens* wurden im Stand der Technik auch als *Corynebacterium thermoaminogenes* bezeichnet, wie
30 zum Beispiel der Stamm FERM BP-1539.

Innerhalb der Gattung *Bacillus* wird die Art *Bacillus subtilis* bevorzugt.

Innerhalb der Gattung *Arthrobacter* wird die Art *Arthrobacter citreus* bevorzugt.

- 5 Innerhalb der Familie der Enterobacteriaceae werden die Gattungen *Escherichia*, *Erwinia*, *Providencia*, *Pantoea* und *Serratia* bevorzugt. Die Gattungen *Escherichia* und *Serratia* werden besonders bevorzugt. Bei der Gattung *Escherichia* wird die Art *Escherichia coli*, bei der Gattung *Serratia*
- 10 wird die Art *Serratia marcescens* und bei der Gattung *Providencia* wird die Art *Providencia rettgeri* ganz besonders bevorzugt.

- Die für die Maßnahmen der Überexpression des L-Ornithin-Exporters eingesetzten Bakterien bzw. Stämme
- 15 (Ausgangsstämme) besitzen bevorzugt bereits die Fähigkeit L-Ornithin in das sie umgebende Nährmedium auszuscheiden und dort zu akkumulieren. Hierfür wird im Folgenden auch der Ausdruck „produzieren“ verwendet. Insbesondere besitzen die für die Maßnahmen der Überexpression eingesetzten
- 20 Stämme die Fähigkeit $\geq 0,1$ g/l, $\geq 0,3$ g/l, ≥ 1 g/l, ≥ 3 g/l, ≥ 10 g/l L-Ornithin 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
- 25 Kombination beider Methoden hergestellt wurden.

- Es ist offensichtlich und bedarf keiner weiteren Erklärungen, dass man zu einem für die Maßnahmen der Erfindung geeignetem Bakterium auch dadurch gelangen kann, indem man in einem Wildstamm, wie zum Beispiel in dem
- 30 *Corynebacterium glutamicum* Typstamm ATCC 13032 oder in dem Stamm ATCC 14067, zunächst ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, welches die Aktivität eines L-Ornithin-Exporters hat und dessen Aminosäuresequenz zu mindestens ($\geq$) 35% identisch ist mit der von SEQ ID NO:2, wobei
- 35 gegebenenfalls die Länge des kodierten Polypeptids sich in

- den oben beschriebenen Längenbereichen befindet, überexprimiert und anschließend durch weitere, im Stand der Technik beschriebene, genetische Maßnahmen, das Bakterium veranlasst, L-Ornithin zu produzieren. Die Transformation
- 5 eines Wildtyps, wie z. B. dem Stamm ATCC13032, ATCC14067, ATCC13869 oder ATCC17965, allein mit dem genannten Polynukleotid führt zu keinem erfindungsgemäßen Verfahren.

L-Ornithin ausscheidende bzw. produzierende Stämme der Art *Corynebacterium glutamicum* sind beispielsweise:

- 10 *Brevibacterium lactofermentum* FERM-BP 2344, und *Corynebacterium glutamicum* FERM-BP 2345 beschrieben in US5188947.

Ein L-Ornithin ausscheidender bzw. produzierender Stamm der Art *Arthrobacter citreus* ist beispielsweise:

- 15 *Arthrobacter citreus* FERM-BP 2342 beschrieben in US5188947.

Ein L-Ornithin ausscheidender bzw. produzierender Stamm der Art *Bacillus subtilis* ist beispielsweise:

Bacillus subtilis BOR-32 (FERM-P 3647) beschrieben in JP57041912.

- 20 Ein L-Ornithin ausscheidender bzw. produzierender Stamm der Art *Providencia rettgeri* ist beispielsweise:

Providencia rettgeri ARG6 (FERM P-11147) beschrieben JP03195494.

- 25 Ein L-Ornithin ausscheidender bzw. produzierender Stamm der Art *Escherichia coli* ist beispielsweise:

Escherichia coli B-19-19 (ATCC 21104) beschrieben in US3668072.

- L-Ornithin produzierende Bakterien sind typischerweise auxotroph für die Aminosäuren L-Citrullin oder L-Arginin.
- 30 Alternativ sind auch L-Ornithin produzierende Bakterien denkbar, die bradytroph für L-Citrullin oder L-Arginin

sind. Definitionen der Begriffe auxotroph und bradytroph finden sich beispielsweise auf Seite 9 von WO 01/09286. Bradytrophe werden in der Fachwelt auch als leaky-Mutanten bezeichnet. Bei den bradytrophen Bakterien werden

5 insbesondere solche verwendet bei denen die Aktivität der Genprodukte ArgF (Ornithin carbamoyltransferase), ArgG (Argininosuccinat Synthase) oder ArgH (Argininosuccinat Lyase) größer ($>$) Null aber kleinergleich ($\leq$) 10 Prozent, bevorzugt $>$ Null und ≤ 1 %, im Vergleich zur Aktivität im

10 Wildtyp vorliegt.

Im Stand der Technik sind als lysE-Gen bezeichnete Polynukleotide bekannt, die für Proteine bzw. Polypeptide kodieren, die die Aktivität eines L-Lysinexporters besitzen. Diese Polypeptide werden auch als LysE abgekürzt.

15 Ein Exporter ist ein Protein, welches in der Zellmembran einer Zelle vorliegt und einen Metaboliten, z.B. L-Lysin oder L-Ornithin, aus dem Cytoplasma der Zelle heraus in das umgebende Medium transportiert. Wird die hierfür erforderliche Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP)

20 bereitgestellt spricht man von primär aktivem Transport bzw. Export. Wird diese in Form eines Ionen-Gradienten von z.B. Natriumionen bereitgestellt spricht man von sekundär aktivem Transport bzw. Export (Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko und L. Stryer; Biochemie, 5. Auflage, Seiten 378-

25 384, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 2003). Anleitungen zur Bestimmung der L-Ornithin Export Aktivität findet man bei Bellmann et al. (Microbiology 2001; 147:1765-74).

Bei den zur vorliegenden Erfindung führenden Arbeiten wurde

30 gefunden, das die Lysinexporter der Gattungen Corynebacterium, bevorzugt Corynebacterium glutamicum, und Micrococcus, bevorzugt Micrococcus luteus, zusätzlich zur Aktivität des L-Lysinexportes die Aktivität eines L-Ornithinexporters besitzen.

Für die Maßnahmen der Erfindung werden Gene eingesetzt, die für Polypeptide mit Exportaktivität für L-Ornithin kodieren, deren Aminosäuresequenz zu mindestens ($\geq$) 35%, $\geq$ 40%, $\geq$ 50%, $\geq$ 55%, $\geq$ 60%, $\geq$ 65%, $\geq$ 70%, $\geq$ 75%, $\geq$ 80%, $\geq$ 85%, $\geq$ 90%, $\geq$ 92%, $\geq$ 94%, $\geq$ 96%, $\geq$ 97%, $\geq$ 98%, $\geq$ 99% oder 100%, bevorzugt $\geq$ 70%, besonders bevorzugt $\geq$ 90%, ganz besonders bevorzugt $\geq$ 96% und äußerst bevorzugt 100% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2, wobei gegebenenfalls die Länge des kodierten Polypeptids sich in den oben beschriebenen Längenbereichen befindet.

Geeignete L-Ornithinexporter sind beispielsweise die Lysinexporter bzw. LysE-Polypeptide von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 (SEQ ID NO:2), *Corynebacterium glutamicum* R (SEQ ID NO:4), *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 (SEQ ID NO:5), *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 (SEQ ID NO:7), *Corynebacterium efficiens* YS-314 (SEQ ID NO:9), *Corynebacterium diphtheriae* NCTC 13129 (SEQ ID NO:10), *Corynebacterium striatum* ATCC6940 (SEQ ID NO:11), *Corynebacterium aurimucosum* ATCC700975 (SEQ ID NO:12), *Corynebacterium matruchotii* ATCC33806 (SEQ ID NO:13), *Corynebacterium pseudogenitalium* ATCC33035 (SEQ ID NO:14), *Corynebacterium accolens* ATCC49725 (SEQ ID NO:15), *Corynebacterium glucuronalyticum* ATCC 51867 (SEQ ID NO:16), *Micrococcus luteus* NCTC2665 (SEQ ID NO:17), *Corynebacterium tuberculostearicum* SK141 (SEQ ID NO:18) und *Corynebacterium matruchotii* ATCC14266 (SEQ ID NO:19). SEQ ID NO:18 und SEQ ID NO:19 werden in der Fachwelt auch als ArgO-Polypeptide bezeichnet.

Die Nukleotidsequenz der *lysE*-Gene von *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 und *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 wurde in dieser Arbeit bestimmt (SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8). Die Aminosäuresequenzen des LysE-Polypeptids von *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 und *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 sind in SEQ ID NO:5 und 7 dargestellt. Sie sind identisch zu der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz des LysE von *C. glutamicum* ATCC13032.

- In Tabelle 1 sind die Zugangsnummern (accession number), von LysE-Polypeptiden verschiedener Vertreter der Gattung *Corynebacterium* und von *Micrococcus luteus* aufgeführt, die den Datenbanken des National Center for Biotechnology
- 5 Information (NCBI, Bethesda, MD, US) entnommen wurden. Weiterhin wird in Tabelle 1 auf die im Sequenzprotokoll wiedergegebenen Aminosäuresequenzen des LysE-Polypeptids verwiesen. Schließlich ist in Tabelle 1 die Länge (Anzahl der Aminosäuren) des kodierten LysE-Polypeptides angegeben.

Tabelle 1

Bakterium	SEQ ID NO:	Zugangsnummer	Länge des Polypeptides
<i>C. glutamicum</i>	2	YP_225551.1	233
<i>C. efficiens</i>	9	ZP_05749209.1	228
<i>C. diptheriae</i>	10	NP_939452.1	228
<i>C. striatum</i>	11	ZP_03933958.1	222
<i>C. aurimucosum</i>	12	YP_002834652.1	235
<i>C. matruchotii</i>	13	ZP_03711883.1	244
<i>C. pseudogenitalium</i>	14	ZP_03922319.1	230
<i>C. accolens</i>	15	ZP_03931790.1	241
<i>C. glucuronolyticum</i>	16	ZP_03918361.1	261
<i>M. luteus</i>	17	YP_002958101.1	204
<i>C. tuberculostearicum</i>	18	ZP_05365683.1	230
<i>C. matruchotii</i>	19	ZP_04835056.1	244

In Abbildung 1 ist ein Mehrfach-Vergleich (multiple sequence alignment) der Aminosäuresequenzen der LysE-Polypeptide der in Tabelle 1 angegebenen Bakterien dargestellt. Die in Abbildung 1 dargestellten Vergleiche der Aminosäuresequenzen wurden mit dem Programm Clone Manager 9 Professional Edition (Scientific & Educational Software 600 Pinner Weald Way Ste 202 Cary NC 27513 USA) angefertigt. Als Referenzmolekül für den Vergleich wurde das LysE-Polypeptid (LysE) von ATCC13032 verwendet. Für Treffermatrix (scoring matrix) wurde die Einstellung „Blosom 62“ (Siehe: Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko und L.

Stryer; Biochemie, 5. Auflage, Seiten 194-197, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 2003)) gewählt.

- Gegebenenfalls können auch im Stand der Technik
- 5 beschriebene Programme eingesetzt werden wie beispielsweise das Programm ClustalX (Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis
- 10 tools. Nucleic Acids Research, 25:4876-4882).

- Die Aminosäurereste 4 - 236 des LysE-Polypeptids von *Corynebacterium glutamicum* R (Siehe SEQ ID NO:4) entsprechen der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz des LysE von *C. glutamicum* ATCC13032. Am
- 15 N-Terminus besitzt das Polypeptid von *C. glutamicum* R zusätzlich eine Sequenz von drei Aminosäureresten (Methionin-Valin-Isoleucin). Diese zusätzlichen Reste ergeben sich, wenn alternativ zum Start-Codon des *lysE*-Gens in *C. glutamicum* ATCC13032 (siehe SEQ ID NO:1) das 9
- 20 Basenpaare weiter stromaufwärts vom *lysE*-Gen vorliegende Start-Codon verwendet wird.

- Die Aminosäuresequenz des LysE-Polypeptids von *C. efficiens* YS-314 ist 71 % und die von *C. diptheriae* NCTC 13129 44%, die von *Corynebacterium striatum* ATCC6940 44%, die von
- 25 *Corynebacterium aurimucosum* ATCC700975 42%, die von *Corynebacterium matruchotii* ATCC33806 43%, die von *Corynebacterium pseudogenitalium* ATCC33035 43%, die von *Corynebacterium accolens* ATCC49725 43%, die von *Corynebacterium glucuronalyticum* ATCC 51867 36%, die von
- 30 *Micrococcus luteus* NCTC2665 40% identisch zu der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz des LysE von *C. glutamicum* ATCC13032. Ferner ist die Aminosäuresequenz des ArgO-Polypeptids von *C. tuberculostearicum* SK141 zu 43% identisch zur Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2. Ferner ist
- 35 die Aminosäuresequenz des ArgO-Polypeptids von *C. matruchotii* ATCC14266 zu 44% identisch zur

Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2. Der Prozentsatz an Identität wurde durch Erstellung eines globalen Sequenzalignments mit Hilfe des Programmes Clone Manager 9 unter Verwendung der Einstellung Blossum 62 angefertigt
5 (Siehe Abb. 2).

Die lysE-Gene, d. h. die Polynukleotide, die für Polypeptide mit der Aktivität eines L-Ornithin Exporters kodieren, können aus den Organismen mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung geeigneter
10 Primer isoliert werden. Anleitungen findet man unter anderem im Laborhandbuch „PCR“ von Newton und Graham (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994) und in der WO 2006/100211 auf Seite 14 bis 17.

Für ein erfindungsgemäßes Verfahren werden besonders
15 bevorzugt Gene eingesetzt, die für Polypeptide mit L-Ornithin Export Aktivität kodieren, deren Aminosäuresequenz eines oder mehrere der Merkmale enthält ausgewählt aus der Gruppe

- a) Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:4,
- 20 b) Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 einschließlich eine oder mehrere, maximal 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, oder 1 Deletion(en) von Aminosäuren,
- c) Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 einschließlich eine oder mehrere, maximal 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2,
25 oder 1 Insertion(en) von Aminosäuren, und
- d) Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 einschließlich eine oder mehrere, maximal 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, oder 1, bevorzugt maximal 5, 4, 3, 2, oder 1,
30 Austausch(e) (Substitution(en)) von Aminosäuren.
- e) Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 einschließlich eine oder mehrere maximal 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2,

1, bevorzugt maximal 5, 4, 3, 2, oder 1, Addition (en) von Aminosäuren am N-Terminus und/oder am C-Terminus.

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

Weiterhin können Polynukleotide verwendet werden, die mit der zu SEQ ID NO:1, bevorzugt der Kodierregion von SEQ ID NO:1, komplementären Nukleotidsequenz unter stringenten Bedingungen hybridisieren und für ein Polypeptid mit L-Ornithin Export Aktivität kodieren, wobei die Aminosäuresequenz des kodierten Proteins $\geq 70\%$ identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2 und wobei gegebenenfalls die Länge des kodierten Polypeptids sich in den oben beschriebenen Längenbereichen befindet.

Anleitungen zur Hybridisierung von Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotiden findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heißt, es werden nur Hybride

gebildet, bei denen die Sonde d.h. ein Polynukleotid umfassend die zu SEQ ID NO:1, bevorzugt die Kodierregion von SEQ ID NO:1, komplementäre Nukleotidsequenz und die Zielsequenz, d. h. die mit der Sonde behandelten

5 beziehungsweise identifizierten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschriffe durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die

10 Hybridisierungsreaktion wird im Allgemeinen bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschriffen durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein

15 Puffer entsprechend 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Nukleotidsequenz der eingesetzten Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden

20 durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC oder 1x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht

25 werden, wobei eine Temperatur von ca. 50°C - 68°C, ca. 52°C - 68°C, ca. 54°C - 68°C, ca. 56°C - 68°C, ca. 58°C - 68°C, ca. 60°C - 68°C, ca. 62°C - 68°C, ca. 64°C - 68°C, ca. 66°C - 68°C eingestellt wird. Temperaturbereiche von ca. 64°C - 68°C oder ca. 66°C - 68°C werden bevorzugt. Es ist

30 gegebenenfalls möglich, die Salzkonzentration bis auf eine Konzentration entsprechend 0,2x SSC oder 0,1x SSC zu senken. Gegebenenfalls enthält der SSC-Puffer Natriumdodecylsulfat (SDS) in einer Konzentration von 0,1%. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur

35 in Schritten von ca. 1 - 2°C von 50°C auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die mindestens 70%, mindestens 80%, mindestens 90%, mindestens 92%, mindestens

- 94%, mindestens 96%, mindestens 97%, mindestens 98% oder mindestens 99%, gegebenenfalls 100% Identität zur Sequenz beziehungsweise komplementären Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen und für ein Polypeptid mit L-Ornithin-Export-Aktivität kodieren. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).
- 5
- 10 Für die Maßnahmen der Erfindung wird ein Polynukleotid in einem L-Ornithin produzierenden Bakterium bzw. Ausgangs- oder Elternstamm überexprimiert, welches für ein Protein kodiert, welches L-Ornithin Export Aktivität besitzt, wobei die Aminosäuresequenz des kodierten Proteins $\geq 35\%$
- 15 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2 und wobei gegebenenfalls die Länge des kodierten Polypeptids sich in den oben beschriebenen Längenbereichen befindet.

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

Die Begriffe Protein und Polypeptid werden als gegenseitig austauschbar betrachtet.

- Bei der Überexpression werden die Methoden der rekombinanten Überexpression bevorzugt. Hierunter werden
- 30 alle Methoden zusammengefasst bei denen ein Mikroorganismus unter Verwendung eines in-vitro bereitgestellten DNA-Moleküls hergestellt wird. Derartige DNA-Moleküle umfassen beispielsweise Promotoren, Expressionskassetten, Gene, Allele, Kodierregionen etc. Diese werden durch Methoden der

Transformation, Konjugation, Transduktion oder gleichartige Methoden in den gewünschten Mikroorganismus überführt.

Durch die Maßnahmen der Überexpression, wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Polypeptids im

- 5 Allgemeinen um mindestens 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% oder 500%, bevorzugt maximal bis 1000%, 2000%, 4000%, 10000% oder 20000% bezogen auf die Höhe der Aktivität oder Konzentration des Polypeptids im Stamm vor der zur Überexpression führenden Maßnahme, erhöht.
- 10 Gegebenenfalls ist bei Verwendung von Stämmen der Art *Corynebacterium glutamicum* die L-Ornithin-Exportaktivität in Stamm ATCC13032 oder ATCC14067 oder ATCC13869 oder ATCC17965 ein geeigneter Bezugspunkt zur Bestimmung der Überexpression. Bei Verwendung von Stämmen die auf
- 15 ATCC13032 beruhen, bzw. ihren Ursprung haben ist der Stamm ATCC13032 ein geeigneter Bezugspunkt. Ein Beispiel hierfür ist der bei den zur vorliegenden Erfindung führenden Arbeiten hergestellte Stamm ATCC
- 20 13032_Delta_argFRGH/pVWEx1_lyeE, der auf dem Stamm ATCC13032 beruht. Bei Verwendung von Stämmen die auf ATCC14067 beruhen, bzw. ihren Ursprung haben ist der Stamm ATCC14067 ein geeigneter Bezugspunkt. Bei Verwendung von Stämmen die auf ATCC13869 beruhen, bzw. ihren Ursprung haben ist der Stamm ATCC13869 ein geeigneter Bezugspunkt.
- 25 Weitere geeignete Bezugspunkte ergeben sich entsprechender Weise.

Gegebenenfalls ist bei Verwendung von Stämmen der Art *Escherichia coli*, bevorzugt *Escherichia coli* Stamm K12 die L-Ornithin-Exportaktivität in Stamm MG1655 ein geeigneter

- 30 Bezugspunkt zur Bestimmung der Überexpression.

Zur Erzielung einer Überexpression stehen im Stand der Technik eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung.

Hierzu gehören die Erhöhung der Kopienzahl und die Modifikation der Nukleotidsequenzen, die die Expression des

35 Gens steuern bzw. kontrollieren. Die Transkription eines

Gens wird unter anderem kontrolliert durch den Promotor und gegebenenfalls durch Proteine, welche die Transkription unterdrücken (Repressorproteine) oder fördern (Aktivatorproteine). Die Translation der gebildeten RNA wird unter anderem kontrolliert durch die Ribosomenbindungsstelle und das Startkodon. Polynukleotide bzw. DNA-Moleküle, welche einen Promotor und eine Ribosomenbindungsstelle und gegebenenfalls ein Startkodon umfassen, werden auch als Expressionskassette bezeichnet.

Hierzu gehört auch der Einsatz von Varianten von Polypeptiden bzw. Enzymen, die eine erhöhte katalytische Aktivität aufweisen.

Die Erhöhung der Kopienzahl kann durch Plasmide erfolgen, die im Cytoplasma des Bakteriums replizieren. Hierzu sind im Stand der Technik eine Fülle von Plasmiden für die verschiedensten Gruppen von Mikroorganismen beschrieben, mit denen man die gewünschte Erhöhung der Kopienzahl des Gens einstellen kann. Geeignete Plasmide für die Gattung *Escherichia* sind beispielsweise im Handbuch Molecular Biology, Labfax (Ed.: T. A. Brown, Bios Scientific, Oxford, UK, 1991) beschrieben. Geeignete Plasmide für die Gattung *Corynebacterium* sind beispielsweise bei Tauch et al. (Journal of Biotechnology 104 (1-3), 27-40, (2003)), oder bei Stansen et al. (Applied and Environmental Microbiology 71, 5920-5928 (2005)) beschrieben.

Die Verwendung des Plasmids pEC7lysE hinterlegt in DSM 23239 zur Erhöhung der Kopienzahl in *Corynebacterium glutamicum* Stämmen wird von den zur Erfindung führenden Maßnahmen ausgeschlossen. Die Nukleotidsequenz des Plasmids pEC7lysE wurde bestimmt und ist in SEQ ID NO:29 dargestellt.

Die Erhöhung der Kopienzahl um mindestens eine (1) Kopie kann weiterhin durch Einfügen weiterer Kopien in das Chromosom des Bakteriums erfolgen. Geeignete Methoden für die Gattung *Corynebacterium*, bevorzugt *Corynebacterium*

glutamicum, sind beispielsweise in der Patentschrift WO 03/014330, WO 03/040373 und WO 04/069996 beschrieben. In der WO 03/014330 sind Methoden zur Tandem-Verdopplung von Genen am nativen Genort beschrieben. In der WO 03/040373
5 sind Methoden beschrieben um eine zweite oder dritte Kopie eines Gens in weitere Genorte einzubauen, wobei der jeweilige Genort nicht essentiell für Wachstum oder Produktion der jeweiligen Aminosäure, im Falle der vorliegenden Erfindung L-Ornithin, ist. Geeignete Genorte
10 zum Einbau einer zweiten bzw. weiteren Kopie des lysE-Gens in einem erfindungsgemäßen Verfahren sind beispielsweise die Gene odh, sucA, dapA, dapB, ddh, lysA, argR, argF, argG und argH. In der WO 04/069996 (siehe Tabelle 12 und 13) sind intergenische Regionen und Gene, die für Phagen
15 beziehungsweise Phagenkomponenten kodieren, von C. glutamicum beschrieben, welche für den Einbau weiterer Kopien des lysE-Gens geeignet sind.

Geeignete Methoden für die Gattung Escherichia sind beispielsweise der Einbau einer Genkopie in die att-site
20 des Phagen (Yu und Court, Gene 223, 77-81 (1998)), die chromosomale Amplifikation mit Hilfe des Phagen Mu, wie in der EP 0 332 448 beschrieben, oder die von Hamilton et al. (Journal of Bacteriology 174, 4617 - 4622 (1989)) oder Link et al. (Journal of Bacteriology 179, 6228-6237 (1997))
25 beschriebenen Methoden des Genaustausches mit Hilfe konditional replizierender Plasmide.

Die Erhöhung der Genexpression kann weiterhin durch Verwendung eines starken Promotors erzielt werden, der funktionell mit dem zu exprimierenden Gen verknüpft wird.
30 Vorzugsweise wird ein Promotor verwendet, der stärker ist als der natürliche, d. h. der im Wildtyp oder Elternstamm vorhandene Promotor. Hierfür stehen im Stand der Technik eine Fülle von Methoden zur Verfügung.

Geeignete Promotoren und Expressionssysteme für die Gattung
35 Corynebacterium finden sich unter anderem in den Patentschriften EP 0 629 699 A2, US 2007/0259408 A1 (gap-

Promotor), WO 2006/069711, EP 1 881 076 A1, WO 2008/088158, WO 2009/025470 (butA-Promotor, pyk-Promotor), US 6,861,246 (MC20- und MA16-Variante des dapA-Promotors) und EP 1 918 378 A1 (sod-Promotor) und in zusammenfassenden

5 Darstellungen wie dem „Handbook of Corynebacterium glutamicum“ (Eds.: Lothar Eggeling und Michael Bott, CRC Press, Boca Raton, US (2005)) oder dem Buch „Corynebacteria, Genomics and Molecular Biology“ (Ed.: Andreas Burkovski, Caister Academic Press, Norfolk, UK

10 (2008)). Beispiele für Promotoren, die eine kontrollierte, das heißt induzierbare oder reprimierbare Expression erlauben, sind beispielsweise bei Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)) beschrieben.

Geeignete Promotoren für die Gattung Escherichia sind seit

15 langem bekannt. Hierzu gehören unter anderem die klassischen Promotoren lac-Promotor, trp-Promotor, die Hybrid-Promotoren tac und trc, die Promotoren PL und PR des Phagen λ . In gleicher Weise können die Promotoren des Phagen T7, die gear-box-Promotoren, der nar-Promotor oder

20 die Promotoren der Gene rrsG, rnpB, csrA, csrB, ompA, fusA, pepQ, rplX oder rpsG verwendet werden. Eine kontrollierte Expression erlaubt beispielsweise das cI857-PR- oder das cI857-PL-System des Phagen λ (Götting et al., BioTechniques 24, 362-366 (1998)). Zusammenfassende Darstellungen finden

25 sich bei Makrides (Microbiological Reviews 60(3), 512-538 (1996)) oder dem Handbuch „Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology“ (F. C. Neidhardt (Editor in Chief), ASM Press, Washington, US (1996)).

Derartige Promotoren oder Expressionskassetten werden

30 typischerweise im Abstand von 1 bis 1000, bevorzugt 1 bis 500, Nukleotiden stromaufwärts des ersten Nukleotids des Startkodons der Kodierregion des Gens eingesetzt. Im Abstand von 1 bedeutet, dass der Promotor oder die Expressionskassette direkt vor die erste Base des

35 Startkodons der Kodierregion positioniert wird.

Zur Steigerung der Expression des lysE-Gens in *C. glutamicum* werden geeignete Promotoren wie beispielsweise der sod-Promotor von *C. glutamicum* (siehe SEQ ID NO:1 von EP 1918 378 A1) oder der gap-Promotor von *C. glutamicum*
5 (siehe SEQ NO:3 von US 2007/0259408) bevorzugt zwischen Position 930 und 990 von SEQ ID NO:1 eingefügt.

Bei Verwendung von Expressionskassetten, enthaltend einen Promotor und eine Ribosomenbindungsstelle (RBS), wie beispielsweise die Expressionseinheit des sod-Gens von *C. glutamicum* (siehe SEQ ID NO:2 von EP 1918 378 A1) oder die
10 Expressionseinheit des gap-Gens von *C. glutamicum*, beschrieben in US 2007/0259408 und wiedergegeben in SEQ ID NO:28 (und dort bezeichnet als PgapRBS), werden diese im Falle von *C. glutamicum* bevorzugt zwischen Position 930 und
15 1001, besonders bevorzugt zwischen Position 1000 und 1001 von SEQ ID NO:1 eingefügt. Eine geeignete Ribosomenbindestelle in einer derartigen Expressionskassette ist beispielsweise die von Amador (Microbiology 145, 915-924 (1999)) angegebene
20 Nukleotidsequenz 5'-agaaaggagg-3'.

Es ist ebenfalls möglich, mehrere Promotoren vor das gewünschte Gen zu positionieren bzw. funktionell mit dem zum exprimierenden Gen zu verknüpfen und auf diese Weise zu einer erhöhten Expression zu gelangen. Dies ist
25 beispielsweise in der WO 2006/069711 beschrieben.

Die Struktur von Promotoren von *Corynebacterium glutamicum* und *Escherichia coli* ist gut bekannt. Es ist daher möglich, die Stärke eines Promotors durch Modifikation seiner Sequenz mittels einem oder mehreren Austausch(en) und/oder
30 einer oder mehrerer Insertion(en) und/oder einer oder mehrerer Deletion(en) von Nukleotiden zu erhöhen. Beispiele hierfür finden sich unter anderem in „Herder Lexikon der Biologie“ (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland (1994)).

Eine geeignete Maßnahme zur Überexpression des lysE-Gens ist dementsprechend die Modifikation bzw. Mutation des Promotors des lysE-Gens.

Die Struktur der Ribosomenbindungsstelle von
5 Corynebacterium glutamicum und von Escherichia coli ist ebenfalls gut bekannt und beispielsweise bei Amador (Microbiology 145, 915-924 (1999)) und in Hand- und Lehrbüchern der Genetik, wie beispielsweise „Gene und Klone“ (Winnacker, Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland
10 (1990)) oder „Molecular Genetics of Bacteria“ (Dale und Park, Wiley and Sons Ltd., Chichester, UK (2004)) beschrieben. Gut exprimierte Gene, d.h. die wichtigsten Strukturgene in einem Organismus, verfügen über eine gute Ribosomenbindestelle (Amador, Microbiology 145, 915-924
15 (1999)), d.h. diese hat eine hohe Ähnlichkeit zur oder entspricht der Consensussequenz. Es wurde in der Literatur gezeigt, dass hochexprimierte Gene eine starke Ribosomenbindestelle aufweisen (Karlin and Mrázek, Journal of Bacteriology 2000; 182(18):5238-50). Die
20 Translationseffizienz eines Gens bzw. der m-RNA kann deshalb durch Anpassung der Ribosomenbindestelle erreicht werden.

Eine weitere Möglichkeit die Translationseffizienz zu steigern, ist die Anpassung der Codon-Usage in den zu
25 exprimierenden Genen (z.B. Najafabadi et al.; Nucleic Acids Research 2009, 37 (21): 7014-7023).

Zur Erzielung einer Überexpression ist es ebenfalls möglich, die Expression von Aktivatorproteinen zu steigern oder die Expression von Repressorproteinen zu verringern
30 oder auszuschalten.

Das Aktivatorprotein LysG für die Expression von lysE wurde von Bellmann et al. (Microbiology 2001; 147:1765-74) beschrieben. Es wird dort als „positive regulator“ bezeichnet. Die Aminosäuresequenz von LysG von
35 Corynebacterium glutamicum ATCC13032 ist in SEQ ID NO:30

wiedergegeben. In einem globalen Sequenzalignment ist die Aminosäuresequenz des LysG-Polypeptids von *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129 zu 62%, die Aminosäuresequenz des LysG-Polypeptids von *Corynebacterium efficiens* YS-314 zu 81% und die Aminosäuresequenz des LysG-Polypeptids von *Corynebacterium glutamicum* R 94% identisch mit der von SEQ ID NO:30.

Bei den Aktivatorproteinen wird ein Polypeptid bevorzugt, welches $\geq$ (mindestens) 55%, bevorzugt $\geq$ 80%, besonders bevorzugt $\geq$ 90%, $\geq$ 92% oder $\geq$ 94 %, ganz besonders bevorzugt $\geq$ 99% und äußerst bevorzugt 100 % identisch ist mit der in SEQ ID NO:30 dargestellten Aminosäuresequenz.

Die genannten Maßnahmen zur Überexpression, bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe Erhöhung der Kopienzahl, Verwendung eines starken Promotors, Mutation des Promotors, Verwendung einer geeigneten Expressionskassette und Überexpression eines Aktivatorproteins, können in geeigneter Weise miteinander kombiniert werden. So kann beispielsweise die Verwendung eines geeigneten Promotors mit der Erhöhung der Kopienzahl oder die Überexpression eines Aktivatorproteins kann mit der Verwendung eines geeigneten Promotors oder einer geeigneten Expressionskassette kombiniert werden.

Es ist ebenfalls möglich, zusätzlich zu den Maßnahmen die das Polynukleotid betreffen, welches für ein Protein mit L-Ornithin Export Aktivität kodiert, einzelne Biosynthesegene abzuschwächen.

So ist es gegebenenfalls zweckmäßig für die Verbesserung der Produktion von L-Ornithin, zusätzlich eines oder mehrere der Gene ausgewählt aus der Gruppe

- a) odhA-Gen, das für die E1-Untereinheit der alpha-Ketoglutarat-Dehydrogenase (EC 1.2.4.2) kodiert,
- b) sucA-Gen, das für die Dihydrolipoamide Succinyltransferase (EC 2.3.1.61) kodiert,

- c) dapA-Gen, das für eine Dihydrodipicolinat-Synthase (DapA, EC 4.2.1.52) kodiert,
- d) dapB-Gen, das für eine Dihydrodipicolinat-Synthase (DapB, EC 1.3.1.26) kodiert,
- 5 e) ddh-Gen, das für eine meso-Diaminopimelat Dehydrogenase (Ddh, EC 1.4.1.16) kodiert,
- f) lysA-Gen, das für eine Diaminopimelat-Decarboxylase (LysA, EC 4.1.1.20) kodiert,
- g) argR-Gen, das für einen/den Repressor (ArgR) der
10 Biosynthese von L-Arginin kodiert,
- h) argF-Gen, das für eine Ornitin Carbamoyl Transferase (ArgF, EC 2.1.3.3) kodiert,
- i) argG-Gen, das für eine Argininosuccinat Synthase (ArgG, EC 6.3.4.5) kodiert,
- 15 j) argH-Gen, das für eine Argininosuccinat Lyase (ASAL) (ArgH, EC 4.3.2.1) kodiert,
- k) lysC-Gen, das für eine Aspartatkinase (LysC, EC 2.7.2.4) kodiert, und
- l) asd-Gen, das für eine Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase
20 (Asd, EC 1.2.1.11) kodiert.

abzuschwächen.

Bevorzugt wird die Abschwächung eines oder mehrerer der Gene ausgewählt aus der Gruppe lysA, odhA, argR, argF, argG und argH. Besonders bevorzugt wird die Abschwächung eines
25 oder mehrerer der Gene ausgewählt aus der Gruppe lysA, odhA und argF. Ganz besonders bevorzugt wird die Abschwächung der Gene lysA und/oder argF.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der
30 intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme

(Proteine) in einem Bakterium, 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 Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Eine Übersicht über bekannte Promotoren verschiedener Stärke in *Corynebacterium glutamicum* findet man bei Pátek et al. (Journal of Biotechnology 104, 311-323 (2003)). Weitere schwache Promotoren sind in der Mitteilung 512057 der Zeitschrift Research Disclosure vom Dezember 2006 (Seiten 1616 bis 1618) beschrieben.

Als Mutationen zur Erzeugung einer Abschwächung kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen von mindestens einem (1) Basenpaar bzw. Nukleotid in der Kodierregion des betreffenden Gens in Betracht. In Abhängigkeit von der Wirkung des durch die Mutation hervorgerufenen Aminosäureaustausches auf die Aktivität des Proteins bzw. Enzyms wird von Fehlsinnmutationen („missense mutations“) oder Nichtsinnmutationen („nonsense mutations“) gesprochen.

Die Fehlsinnmutation führt zu einem Austausch einer gegebenen Aminosäure in einem Protein gegen eine andere, wobei es sich insbesondere um einen nicht-konservativen Aminosäureaustausch handelt. Hierdurch wird die Funktionsfähigkeit bzw. Aktivität des Proteins beeinträchtigt und auf einen Wert von ≥ 0 bis 75%, ≥ 0 bis 50%, ≥ 0 bis 25%, ≥ 0 bis 10% oder ≥ 0 bis 5% reduziert.

Die Nichtsinnmutation führt zu einem Stopp-Kodon im Kodierbereich des Gens und damit zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation und somit zu einer Ausschaltung. Insertionen oder Deletionen von mindestens einem Basenpaar in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen („frame shift mutations“), die dazu führen, dass falsche

Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Entsteht als Folge der Mutation ein Stopp-Kodon im Kodierbereich, so führt dies ebenfalls zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation. Die Maßnahmen zur

5 Erzeugung einer Nichtsinntmutation werden vorzugsweise im 5'-terminalen Teil der Kodierregion durchgeführt, welcher für den N-Terminus des Polypeptids kodiert. Bezeichnet man die Gesamtlänge eines Polypeptids (gemessen als Anzahl der chemisch verbundenen L-Aminosäuren) mit 100%, so gehört -

10 im Rahmen der vorliegenden Erfindung - zum N-Terminus des Polypeptids der Teil der Aminosäuresequenz, welcher, gerechnet ab der Start-Aminosäure L-Formyl-Methionin 80% der nachfolgenden L-Aminosäuren enthält.

In-vivo Mutagenesemethoden sind beispielsweise im Manual of

15 Methods for General Bacteriology (Gerhard et al. (Eds.), American Society for Microbiology, Washington, DC, USA, 1981) oder bei Tosaka et al. (Agricultural and Biological Chemistry 42(4), 745-752 (1978)) oder bei Konicek et al. (Folia Microbiologica 33, 337-343 (1988)) beschrieben.

20 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 OxyRated Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press,

25 Cold Spring Harbor, 1992), die Verwendung mutagener Oligonukleotide (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)) und

30 der Einsatz einer Polymerasekettenreaktion unter Verwendung einer DNA-Polymerase, die eine hohe Fehlerquote aufweist. Eine derartige DNA-Polymerase ist beispielsweise die Mutazyme DNA Polymerase (GeneMorph PCR Mutagenesis Kit, Nr.600550) der Firma Stratagene (LaJolla, CA, USA).

35 Weitere Anleitungen und Übersichten zur Erzeugung von Mutationen in-vivo oder in-vitro können dem Stand der

Technik und bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Mit Hilfe des bekannten Verfahren des Gen- bzw. Allel-Austauschs, das in seinen Grundzügen bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)) beschrieben ist kann eine in-vitro hergestellte Mutation, bzw. ein Polynukleotid enthaltend die gewünschte Mutation in das Chromosom überführt werden. Von Schäfer et al. (Gene 145, 69-73 (1994)) wurde diese Methode eingesetzt, um eine Deletion in das *hom-thrB* Operon von *C. glutamicum* 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 in das Chromosom von *C. glutamicum* einzubauen.

Ein Methode zur gezielten Verringerung der Genexpression besteht darin, das abzuschwächende Gen unter die Kontrolle eines durch Zugabe dosierter Mengen von IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) induzierbaren Promotors, wie zum Beispiel des *trc*-Promotors oder des *tac*-Promotors, zu stellen. Hierzu eignen sich Vektoren wie beispielsweise der *Escherichia coli* Expressionsvektor pXK99E (W00226787; hinterlegt gemäß Budapest Vertrag am 31. Juli 2001 in DH5alpha/pXK99E als DSM14440 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland)), pEKEx2 (NCBI Accession No. AY585307) oder pVWEx2 (Wendisch, Ph. D. thesis, Berichte des Forschungszentrums Jülich, Jül-3397, ISSN 0994-2952, Jülich, Deutschland (1997)), die eine IPTG-abhängige Expression des klonierten Gens in *Corynebacterium glutamicum* ermöglichen.

Eingesetzt wurde diese Methode beispielsweise in der Patentschrift WO0226787 zur regulierten Expression des deaD-Gens durch Integration des Vektors pXK99EdeaD in das Genom von Corynebacterium glutamicum und von Simic et al.

- 5 (Applied and Environmental Microbiology 68: 3321-3327 (2002)) zur regulierten Expression des glyA-Gens durch Integration des Vektors pK18mobglyA' in Corynebacterium glutamicum.

- 10 Eine weitere Methode zur spezifischen Verringerung der Genexpression ist die Antisense-Technik, wobei kurze Oligodesoxynukleotide oder Vektoren zur Synthese längerer Antisense-RNA in die Zielzellen gebracht werden. Die Antisense-RNA kann dort an komplementäre Abschnitte spezifischer mRNAs binden und deren Stabilität verringern
15 oder die Translatierbarkeit blocken. Ein Beispiel hierzu findet der Fachmann bei Srivastava et al. (Applied Environmental Microbiology 2000 Oct; 66 (10): 4366 - 4371).

- Die Geschwindigkeit der Elongation wird durch die Kodon-Verwendung beeinflusst. Durch die Verwendung von Kodons für
20 im Elternstamm (parent strain) selten vorkommenden t-RNAs kann die Genexpression abgeschwächt werden. Dies ist ausführlich in der WO2008049781 und in der WO2009133063 beschrieben. Beispielsweise kann der Austausch eines ATG Start-Kodons zu den seltener vorkommenden Kodons GTG oder
25 TTG die Translation verschlechtern, da das Kodon AUG zwei- bis dreimal effektiver ist als zum Beispiel die Kodons GUG und UUG (Khudyakov et al., FEBS Letters 232(2):369-71 (1988); Reddy et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 82(17):5656-60 (1985)).

- 30 Es ist ebenfalls möglich, zusätzlich zu den Maßnahmen die das Polynukleotid betreffen, welches für ein Protein mit L-Ornithin Export Aktivität kodiert, einzelne Biosynthesegene zu verstärken.

- So ist es gegebenenfalls zweckmäßig für die Verbesserung
35 der Produktion von L-Ornithin, zusätzlich die

Enzymaktivität eines oder mehrere der Proteine ausgewählt aus der Gruppe

- a) Glutamat-Dehydrogenase (EC 1.4.1.3) kodiert vom gdh-Gen,
- 5 b) Glutamat N-Acetyltransferase (EC 2.3.1.35 und EC 2.3.1.1) kodiert vom argJ-Gen,
- c) Acetylglutamatkinase (EC 2.7.2.8) kodiert vom argB-Gen,
- 10 d) N-Acetyl-Gamma-Glutamyl-Phosphat-Reduktase (EC 1.2.1.38) kodiert vom argC-Gen,
- e) Acetyl-Ornithin Aminotransferase (EC 2.6.1.11), kodiert vom argD-Gen,
- f) Glukose spezifische Komponente EIIB (PtsG) (EC 2.7.1.69) des Glukose-Aufnahmesystems kodiert vom
15 ptsG-Gen,
- g) Saccharose spezifische Komponente EIIB (PtsS) (EC 2.7.1.69) des Saccharose-Aufnahmesystems kodiert vom ptsS-Gen,
- h) Glucose-6-Phosphat 1- Dehydrogenase (EC 1.1.1.49)
20 kodiert vom zwf-Gen,
- i) Glucose-6-Phosphat-Isomerase (EC 5.3.1.9) kodiert vom pgi-Gen,
- j) Phosphofructokinase (EC 2.7.1.11) kodiert vom pfkA-Gen,
- k) Fructose-bisphosphat aldolase (EC 4.1.2.13) kodiert
25 vom fda-Gen,
- l) Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (EC 1.2.1.59), kodiert vom gap-Gen,
- m) Phosphoglycerat Kinase (EC 2.7.2.3) kodiert vom pgk-Gen,

- n) Pyruvatkinase (EC 2.7.1.40) kodiert vom pyk-Gen,
- o) E1-Untereinheit der Pyruvat-Dehydrogenase (EC 1.2.4.1) kodiert vom aceE-Gen,
- p) Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (EC 4.1.1.31) kodiert
5 vom ppc-Gen,
- q) Pyruvat-Carboxylase (EC 6.4.1.1), kodiert vom pyc-Gen,
- r) Aconitase (EC 4.2.1.3) kodiert vom acn-Gen, und
- s) Isocitrat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.42) kodiert vom icd-Gen
- 10 zu verstärken.

Der Begriff Verstärkung umfasst die Massnahmen zur Überexpression und die Verwendung von Varianten mit erhöhter katalytischer Aktivität im Vergleich zum Protein des Wildtyps.

- 15 Besonders bevorzugt wird die Verstärkung eines oder mehrerer der Enzyme ausgewählt aus der Gruppe Glutamat-Dehydrogenase, Glutamat N-Acetyltransferase und der Acetylglutamatkinase.

- Die aufgeführten Zusatzmaßnahmen der Abschwächung können
20 mit den Zusatzmaßnahmen der Verstärkung kombiniert werden.

- Anleitungen zum Umgang mit DNA, Verdauung und Ligation von DNA, Transformation und Selektion von Transformanten findet man unter anderem in dem bekannten Handbuch von Sambrook et al. „Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition
25 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

- Das Ausmaß der Expression beziehungsweise Überexpression kann durch Messung der Menge bzw. Konzentration der vom Gen transkribierten mRNA, durch Bestimmung der Menge bzw. Konzentration des Polypeptids und durch Bestimmung der Höhe
30 der Enzymaktivität festgestellt werden.

Für die Bestimmung der Menge an mRNA können unter anderem die Methode des „Northern Blotting's" und der quantitativen RT-PCR verwendet werden. Bei der quantitativen RT-PCR wird der Polymerase-Kettenreaktion eine reverse Transkription vorgeschaltet. Hierzu kann das LightCycler™ System der Firma Roche Diagnostics (Boehringer Mannheim GmbH, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland) verwendet werden, wie beispielsweise bei Jungwirth et al. (FEMS Microbiology Letters 281, 190-197 (2008)) beschrieben. Die Konzentration des Proteins kann über 1- und 2-dimensionale Proteingelaufentrennung und anschließende optische Identifizierung der Proteinkonzentration mit entsprechender Auswertesoftware im Gel bestimmt werden. 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 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 321: 2630-2647 (1999)) bestimmt werden.

Die hergestellten Bakterien können kontinuierlich - wie beispielsweise in der WO 05/021772 beschrieben- oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung bzw. Satzverfahren) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren, beispielsweise beschrieben in US 6,562,601) zum Zwecke der Produktion von L-Ornithin kultiviert werden. Eine Zusammenfassung allgemeiner Art über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und

periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) verfügbar.

Das zu verwendende Kulturmedium beziehungsweise Fermentationsmedium muß in geeigneter Weise den

5 Anforderungen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology“ der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Die Begriffe Nährmedium, Kulturmedium und

10 Fermentationsmedium beziehungsweise Medium sind gegenseitig austauschbar.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Saccharose-haltige Lösungen aus der Zuckerrüben-

15 oder Zuckerrohrverarbeitung, Stärke, Stärkehydrolysat und Cellulose, Öle und Fette, wie zum Beispiel Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren, wie zum Beispiel Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure,

20 Alkohole wie zum Beispiel Glycerin, Methanol und Ethanol und organische Säuren, wie zum Beispiel Essigsäure oder Milchsäure verwendet werden.

Bei den Zuckern werden Glucose, Fructose, Sacharose, Mischungen aus Glucose und Fruktose, und Mischungen aus Glucose, Fructose und Saccharose bevorzugt. Gegebenenfalls

25 wird Saccharose besonders bevorzugt.

Bei den Alkoholen wird Glycerin bevorzugt.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff

30 oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

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

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

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

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak beziehungsweise Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Der pH wird im Allgemeinen auf einen Wert von 6,0 bis 8,5 vorzugsweise 6,5 bis 8 eingestellt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel, wie zum Beispiel Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete, selektiv wirkende Stoffe, wie zum Beispiel Antibiotika hinzugefügt werden. Die Fermentation wird bevorzugt unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Um diese 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 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°C bis 37°C. Bei batch-Verfahren wird die Kultivierung

- bevorzugt solange fortgesetzt, bis sich eine für die Maßnahme der Gewinnung des gewünschten L-Ornithins ausreichende Menge, gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht. Bei kontinuierlichen Verfahren sind längere Kultivierungszeiten möglich. Durch die Tätigkeit der Bakterien kommt es zu einer Anreicherung bzw. Zunahme der Konzentration (Akkumulation) des L-Ornithins im Fermentationsmedium.
- 10 Beispiele für geeignete Fermentationsmedien finden sich unter anderem in den Patentschriften JP 43010996 B4 (für *B. subtilis*), US 3668072 A (für *E. coli*) und JP 57041912 B (für *B. flavum*).
- 15 Gegebenenfalls beträgt das Volumen des Fermentationsmediums in einem erfindungsgemäßen Verfahren $\geq 0,5$ l, ≥ 1 l, ≥ 5 l, ≥ 10 l, ≥ 50 l, ≥ 100 l, ≥ 500 l, ≥ 1000 l, bevorzugt ≥ 1 l, besonders bevorzugt ≥ 10 l, ganz besonders bevorzugt ≥ 100 l und äußerst bevorzugt ≥ 1000 l.
- 20 Die Analyse von L-Ornithin zur Bestimmung der 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 von Ninhydrin
- 25 erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry 30: 1190-1206 (1958)) beschrieben. Anstelle von Ninhydrin kann auch ortho-Phtadialdehyd zur Nachsäulenderivatisierung eingesetzt werden. Einen Übersichtsartikel zur Ionenaustauschchromatographie findet man bei Pickering
- 30 (LC·GC (Magazine of Chromatographic Science) 7(6), 484-487 (1989)).
- Es ist ebenfalls möglich eine Vorsäulenderivatisierung beispielsweise unter Verwendung von ortho-Phtadialdehyd 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
5 erfolgt photometrisch (Absorption, Fluoreszenz).

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

- 10 Die Leistung der erfindungsgemäßen Verfahren bzw. Fermentationsprozesse bezüglich eines oder mehrerer der Parameter ausgewählt aus der Gruppe der L-Ornithin-Konzentration (gebildetes L-Ornithin pro Volumen), der L-Ornithin-Ausbeute (gebildetes L-Ornithin pro verbrauchter
15 Kohlenstoff-Quelle), der L-Ornithin-Bildung (gebildetes L-Ornithin pro Volumen und Zeit) und der spezifischen L-Ornithin-Bildung (gebildetes L-Ornithin pro Zelltrockenmasse bzw. Biotrockenmasse und Zeit oder gebildetes L-Ornithin pro Zellprotein und Zeit) oder auch
20 anderer Prozess-Parameter und Kombinationen davon, wird um mindestens 0,5%, mindestens 1%, mindestens 1,5% oder mindestens 2% erhöht, bezogen auf Verfahren bzw. Fermentationsprozesse mit Bakterien, in denen ein Protein mit L-Ornithin-Export-Aktivität nicht überexprimiert
25 vorliegt bzw. bei denen keine Maßnahme der Überexpression durchgeführt wurde.

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

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

- Unter einer Fermentationsbrühe versteht man ein Fermentationsmedium bzw. Nährmedium, in dem ein
35 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
5 Produktion des L-Ornithins und typischerweise die Vermehrung bzw. Lebensfähigkeit sicherstellen.

Bei Abschluss der Fermentation enthält die entstandene Fermentationsbrühe dementsprechend

- 10 a) die infolge der Vermehrung der Zellen des Bakteriums entstandene Biomasse (Zellmasse) des Bakteriums,
- b) das im Laufe der Fermentation gebildete L-Ornithin,
- c) die im Laufe der Fermentation gebildeten organischen Nebenprodukte, und
- 15 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 Bakterien neben dem
20 L-Ornithin erzeugt und gegebenenfalls ausgeschieden werden. Hierzu gehören auch Zucker wie zum Beispiel Trehalose.

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

30 Durch eine oder mehrere der Maßnahmen ausgewählt aus der Gruppe

- a) teilweise ($> 0\%$ bis $< 80\%$) bis vollständige (100%) oder nahezu vollständige ($\geq 80\%$, $\geq 90\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$ oder $\geq 99\%$ bis $< 100\%$) Entfernung des Wassers,
- 5 b) teilweise ($> 0\%$ bis $< 80\%$) bis vollständige (100%) oder nahezu vollständige ($\geq 80\%$, $\geq 90\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$ oder $\geq 99\%$ bis $< 100\%$) Entfernung der Biomasse, wobei diese gegebenenfalls vor der Entfernung inaktiviert wird,
- 10 c) teilweise ($> 0\%$ bis $< 80\%$) bis vollständige (100%) oder nahezu vollständige ($\geq 80\%$, $\geq 90\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$, $\geq 99\%$, $\geq 99,3\%$ oder $\geq 99,7\%$ bis $< 100\%$) Entfernung der im Laufe der Fermentation gebildeten organischen Nebenprodukte, und
- 15 d) teilweise ($> 0\%$) bis vollständige (100%) oder nahezu vollständige ($\geq 80\%$, $\geq 90\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$, $\geq 99\%$, $\geq 99,3\%$ oder $\geq 99,7\%$ bis $< 100\%$) Entfernung der durch die Fermentation nicht verbrauchten Bestandteile des eingesetzten
- 20 Fermentationsmediums beziehungsweise der Einsatzstoffe,

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

25 Ornithin aufweisen.

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.

In einer Variante des Verfahrens gelangt man durch

30 vollständige oder nahezu vollständige Entfernung des Wassers, der Biomasse, der organischen Nebenprodukte und der nicht verbrauchten Bestandteile des eingesetzten Fermentationsmediums zu reinen (≥ 80 Gew.-% oder ≥ 90 Gew.-%) oder hochreinen (≥ 95 Gew.-%, ≥ 97 Gew.-% oder $\geq$

99% Gew.-%) Produktformen des L-Ornithins. Für die Maßnahmen gemäß a), b), c) oder d) sind im Stand der Technik eine Fülle von technischen Anleitungen verfügbar.

Im Falle der Aminosäure L-Ornithin bzw. deren Salze sind im
5 Stand der Technik im Wesentlichen drei verschiedene Produkte beschrieben.

Eine Gruppe beschreibt das L-Ornithin HCL, bei welchem das L-Ornithin aus der Fermentationslösung nach Zellabtrennung mittels Ionentauscher aufgereinigt wird und dann über
10 Kristallisation als L-Ornithin Monochlorid und Rekristallisation als L-Ornithin Monochlorid kristallisiert wird (US 2988489). Das erhaltene L-Ornithin-HCL hat dabei eine Reinheit größer als > 90%, bevorzugt größer als 95%, besonders bevorzugt größer als 98,0% und ganz besonders
15 bevorzugt größer als 99%.

Ein weiteres Verfahren ist beschrieben in der Patentanmeldung EP 1995322. Hierbei wird die biomassehaltige Fermentationslösung von oben auf ein schwach sauren Ionentauscher mit einer Partikeldurchmesser
20 > 300µm geben und das L-Ornithin über diesen Schritt aufgereinigt. Durch die Auswahl eines entsprechenden Partikeldurchmesser wird eine Verblockung des Harzes durch die Biomasse verhindert. Die Effizienz der Zellabtrennung lag bei 99%.

25 Das aufgereinigte L-Ornithin kann dann zur Herstellung von verschiedenen L-Ornithin Salzen wie z.B. Mono- oder Di-L-Ornithin- α -Ketoglutarat, L-Ornithin-L-Aspartat etc. eingesetzt werden.

Ein Verfahren zur Herstellung von L-Ornithin-L-Aspartat ist
30 z.B. im Patent EP 0477 991 beschrieben. Dabei wird zu einer wässrigen Lösung aus L-Ornithin und L-Asparat ein wasserlösliches Lösungsmittel gegeben, um eine min. 90% gesättigte oder übersättigte Lösung zu bekommen. Diese wird unter Rückfluss erhitzt, bis die Bildung von Kristallen
35 beendet ist. Dann wird weiter ein wassermischbares

Lösungsmittel unter Rückfluss zugegeben, bis sich die Salzkristalle bilden. Die Kristalle können z.B. über Zentrifugation abgetrennt werden und werden im Anschluss unter Vakuum getrocknet. Die Produktreinheit liegt

5 typischer Weise über 98,5%.

Im Patent JP46003194 ist ein Prozess zur Herstellung von L-Ornithin-L-Ketoglutarat beschrieben. Dabei wird z.B. Ornithin-HCL durch Adsorption an einen sauren Ionentauscher und Elution mit Ammoniakwasser in die freie Base überführt,

10 α -Ketoglutarat zugeben und die Lösung unter Vakuum eingedampft bis das Produkt kristallisiert.

Das Plasmid pEC7lysE wurde in Form des Stammes Escherichia coli DH5alpha/pEC7lysE(DM2204) am 15. Januar 2010 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

15 (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) unter der Zugangsnummer DSM 23239 nach dem Budapester Vertrag hinterlegt.

Beispiele

Beispiel 1:

Klonierung und Sequenzierung des *lysE* - Gens aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

- 5 Das Gen *lysE* des Stammes ATCC13032 wurde in den *E. coli* / *C. glutamicum* Shuttle- und Expressionsvektor pVWEx1 (Peters-Wendisch et al., J. Mol. Microbiol. Biotechnol. (2001) 3(2): 295-300) kloniert.

Die Klonierung wurde in zwei Schritten durchgeführt.

- 10 Zunächst wurde durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR) das Gen aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 mittels folgender, aus Seq ID NO:1 abgeleiteter Oligonukleotid-Primer amplifiziert. Die Oligonukleotide enthielten an ihrem 5'-Ende zusätzliche Restriktionsschnittstellen
- 15 (unterstrichen: EcoRV für *lysE*_1.p und AvrII bzw. SspI für *lysE*_2.p).

*lysE*_1.p: 5'-[TCGATATCATGGAAATCTTCATTACAGG]-3'
(siehe SEQ ID NO:22)

- lysE*_2.p: 5'-[TGCCTAGGTCAATATTTGGGCGAAGGCCACCG]-3'
20 (siehe SEQ ID NO:23)

- Die PCR-Reaktion wurde in Gegenwart von 200 µM Desoxynukleosid-triphosphaten (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), je 0,5 µM des entsprechenden Oligonukleotids, 100 ng chromosomaler DNA von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032,
- 25 1/5 Volumen 5-fach Reaktionspuffer HF und 0,02 U/µl Phusion® Hot Start DNA Polymerase (Biozym Scientific GmbH, D-31840 Hess. Oldendorf) in einem Thermocycler (Mastercycler, Eppendorf AG, Hamburg) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 98°C für 1 min; 30 Zyklen x
- 30 (98°C, 20 s; 63°C, 20s; 72°C, 40s); 72°C für 6 min.

Das 761 bp grosse PCR-*lysE*-Fragment (siehe SEQ ID NO:3) wurde, wie im Folgenden beschrieben, in pVWEx1 kloniert:

Vorbereitung des Vektors: 1 µg Plasmid-DNA von pVWEx1 wurde im enzymespezifischen Puffersystem mit 10 Units des Enzyms PstI durch Inkubation bei 37°C für 1 h gespalten. Direkt im Anschluss wurde der Spaltungsansatz mit dem Quick Blunting
5 Kit (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) nach Herstellerangaben behandelt und danach durch Verwendung des QiaExII-Aufreinigungskits (Qiagen AG, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Der so vorbehandelte Vektor wurde dann mit 10 Units XbaI im enzymespezifischen
10 Puffersystem bei 37°C für 1 h gespalten und danach erneut mit dem QiaExII-Aufreinigungskit aufgereinigt.

Vorbereitung des Inserts: Das lysE-PCR-Fragment wurde mit jeweils 10 Units Enzym AvrII und EcoRV gespalten und danach durch Verwendung des QiaExII-Aufreinigungskits nach
15 Herstellerangaben aufgereinigt.

Ligation: Vektor und Insert wurden in einem molaren Verhältnis von 1:5 gemischt und durch Verwendung von T4-DNA-Ligase bei 16°C für 1 h ligiert. Vom Ligationsansatz wurden 3 µl in chemisch kompetente E.coli DH5alpha Zellen
20 (Subcloning efficiency, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) transformiert.

Transformanten wurden anhand ihrer Kanamycin-Resistenz auf 50 µg/ml Kanamycin-Sulfat enthaltenen LB-Agarplatten identifiziert. Aus 4 der Transformanten wurde Plasmid-DNA
25 isoliert und die Plasmide durch Restriktionsanalyse auf Vorhandensein des 0,75 kb-Fragments als Insert überprüft. Das so entstandene rekombinante Plasmid wurde pVWEx1_lyse bezeichnet.

Die Nukleotidsequenz des 0,75 kb Fragments in Plasmid pVWEx1-lyse wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger et al. bestimmt (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1977) 74: 5463-5467). Hierzu wurde das vollständige Insert des Plasmides pVWEx1_lyse mit Hilfe der Oligonukleotid-Primer
30 pVW_1.p (5'-TGA GCG GAT AAC AAT TTC ACA C-3') und
35 pVW_1.p (5'-TGA GCG GAT AAC AAT TTC ACA C-3') und

pVW_2.p(5'-CGA CGG CCA GTG AAT TCG AG-3') bei der Firma Eurofins MWG Operon GmbH (Ebersberg, Deutschland) sequenziert.

- Die erhaltene Nukleotidsequenz wurde mit dem Programm Clone
5 Manager 9 analysiert und ist als SEQ ID NO:20.
wiedergegeben.

Beispiel 2:

Konstruktion des Vektors pK18mobsacB_DargFRGH zur Deletion
des argFRGH-Bereiches in *Corynebacterium glutamicum*

- 10 Hierzu wurde zuerst chromosomale DNA aus *C. glutamicum*
ATCC13032 nach der Methode von Tauch et al. (1995, Plasmid
33:168-179) isoliert. Auf der Basis der Sequenz der Gene
argFRGH aus *C. glutamicum*, wurden die unten aufgeführten
Oligonukleotide zur Herstellung des argFRGH-
15 Deletionskonstruktes ausgewählt. Das Deletionskonstrukt
wurde mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR), im
speziellen durch die gene SOEing Methode (Gene Splicing by
Overlap Extension, Horton, Molecular Biotechnology 3: 93-98
(1995)) generiert.

- 20 argFRGH_d1:
5'-GGT GGT GCT AGC CCG GCG ATT TCT TTG CAC AT- 3'
(siehe SEQ ID NO:24)

- argFRGH_d2:
5'-AAT GCT TAT CGA CGT ACC CCC CTG TGG TTG TGA AGT CAT A-
25 3' (siehe SEQ ID NO:25)

argFRGH_d3:
5' - GGG GTA CGT CGA TAA GCA TT-3'
(siehe SEQ ID NO:26)

- argFRGH_d4:
30 5'-GGT GGT ATG CAT GGT GAT GGT TCC GAA TGT TG-3'
(siehe SEQ ID NO:27)

Die dargestellten Oligonukleotid-Primer wurden von Eurofins
MWG Operon GmbH (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Die PCR

Reaktion wurde unter Verwendung der Phusion® Hot Start DNA Polymerase (Biozym Scientific GmbH, D-31840 Hess. Oldendorf) in einem Thermocycler (Mastercycler, Eppendorf AG, Hamburg) durchgeführt.

- 5 Der Primer argFRGH_d2 ist zusammengesetzt aus zwei Bereichen. Ein Teil der Nukleotidabfolge ist komplementär zum Bereich von 1 bp stromaufwärts bis 19 bp stromabwärts des Startcodons des argF-Gens. Der andere Teil der Nukleotidabfolge ist komplementär zum Bereich von Nukleotid
10 1419 des argH-Gens bis 5 Nukleotide stromabwärts des argH-Gens.

- Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ermöglichen die Primer argFRGH_1 und argFRGH _2 die Amplifikation eines 543 bp großen DNA-Fragmentes und die Primer argFRGH _3 und
15 argFRGH _4 die Amplifikation eines 513 bp großen DNA-Fragmentes. Die Amplifikate wurden per PCR hergestellt, in einem 0,8%igen Agarosegel elektrophoretisch geprüft, mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Product No. 1732676, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) aus
20 dem Agarosegel isoliert und zusammen als Template für eine weitere PCR-Reaktion mit den Primern argFRGH _1 und argFRGH _4 eingesetzt. Auf diese Weise wurde das 1036 bp große DargFRGH-Deletionsderivat erzeugt (siehe auch SEQ ID NO: 21). Es beinhaltet 477 bp des 3'-Endes des argD-Gens, 19
25 bp des 5'-Endes des argF-Gens, 15 bp des 3'-Endes des argH-Gens sowie 420 bp des 5'-Endes des cg1589-Leserasters. Das so amplifizierte Produkt wurde in einem 0,8%igen Agarosegel elektrophoretisch geprüft.

- Das 1,04 kb große DargFRGH PCR-Produkt (SEQ ID NO: 21)
30 wurde vollständig mit den Enzymen NdeI und NsiI gespalten. Anschließend wurde das Fragment mit dem PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Das auf diese Weise vorbehandelte DargFRGH-Deletionsderivat wurde mit dem mobilisierbaren Klonierungsvektor pK18mobsacB (Schäfer et
35 al. (1994), Gene 14: 69-73) zur Ligation eingesetzt. Dieser war zuvor mit den Restriktionsendonuklease XbaI und PstI

vollständig gespalten worden. Dadurch wurden kompatible DNA-Enden zu den mit NdeI- und NsiI-Spaltung erzeugten Enden des Inserts geschaffen. Der so vorbereitete Vektor wurde mit dem DargFRGH-Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:5 gemischt und durch Verwendung von T4-DNA-Ligase (Amersham- Pharmacia, Freiburg, Germany) bei 16°C für 1 Stunde ligiert. Vom Ligationsansatz wurden 3 µl in chemisch kompetente E.coli DH5alpha Zellen (Subcloning efficiency, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) transformiert. Transformanten wurden anhand ihrer Kanamycin-Resistenz auf 50 µg/ml Kanamycin-Sulfat enthaltenen LB-Agarplatten identifiziert. Aus 4 der Transformanten wurde Plasmid-DNA isoliert (QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen (Hilden)) und die Plasmide durch Restriktionsanalyse auf Vorhandensein des 1,04 kb-Fragments als Insert überprüft. Das so entstandene rekombinante Plasmid wurde pK18mobsacB_DargFRGH bezeichnet. Der Stamm wurde als E.coli_DH5alpha/pK18mobsacB_DargFRGH bezeichnet.

Die Nukleotidsequenz des 1,04 kb Fragments (SEQ ID NO:21) in Plasmid pK18mobsacB_DargFRGH wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger et al. durchgeführt (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1977) 74: 5463-5467). Hierzu wurde das vollständige Insert des Plasmides pK18mobsacB_DargFRGH mit Hilfe der Oligonukleotid-Primer M13 uni (-21) (5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3') und M13 rev (-49) (5'- GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG-3') bei der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) sequenziert und so auf Richtigkeit überprüft.

Beispiel 3:
Herstellung des Stammes Corynebacterium glutamicum ATCC 13032_DargFRGH

Der in Beispiel 2 genannte Vektor pK18mobsacB_DargFRGH wurde mittels Konjugation nach einem Protokoll von Schäfer et al. (Journal of Microbiology 172: 1663-1666 (1990)) in den Corynebacterium glutamicum Stamm ATCC13032

transferiert. Dazu wurde der Vektor zuvor in Stamm E.coli S17-1 transformiert (Simon et al., Biotechnology 1:784-791). Die Identität des Vektors in S17-1 wurde Analog zum Nachweis in E.coli DH5alpha (siehe Beispiel 2) geprüft.

- 5 Der Vektor pK18mobsacB bzw. pK18mobsacB_DargFRGH kann in C. glutamicum ATCC13032 nicht selbständig replizieren und bleibt nur dann in der Zelle erhalten, wenn er als Folge eines Rekombinationsereignisses ins Chromosom integriert hat. Die Selektion von Klonen mit integriertem
- 10 pK18mobsacB_DargFRGH erfolgt durch Ausplattieren des Konjugationsansatzes auf LB-Agar (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, New York, 1989), der mit 15 mg/l Kanamycin und 50 mg/ml Nalidixinsäure supplementiert worden ist.
- 15 Angewachsene Klone werden auf LB-Agarplatten mit 25 mg/l Kanamycin ausgestrichen und für 16 Stunden bei 33°C inkubiert. Zur Selektion von Mutanten, bei denen als Folge eines zweiten Rekombinationsereignisses die Exzision des Plasmides stattgefunden hat, werden die Klone 20 Stunden
- 20 unselektiv in LB-Flüssigmedium kultiviert, anschließend auf LB-Agar mit 10% Sucrose ausgestrichen und 24 Stunden bebrütet.

- Das Plasmid pK18mobsacB_DargFRGH enthält ebenso wie das Ausgangsplasmid pK18mobsacB neben dem Kanamycin-
- 25 Resistenzgen eine Kopie des für die Levan-Sucrase aus Bacillus subtilis kodierenden sacB-Gens. Die durch Sucrose induzierbare Expression führt zur Bildung der Levan-Sucrase, die die Synthese des für C. glutamicum toxischen Produktes Levan katalysiert. Auf LB-Agar mit Sucrose
- 30 wachsen daher nur solche Klone an, bei denen das integrierte pK18mobsacB_DargFRGH wiederum exzisiert hat. Bei der Exzision kann zusammen mit dem Plasmid entweder die vollständige chromosomale Kopie von argFRGH exzisieren, oder die unvollständige Kopie mit der internen Deletion von
- 35 argFRGH.

Ungefähr 40 bis 50 Kolonien wurden auf den Phänotyp „Wachstum in Gegenwart von Sucrose“ und „Nicht-Wachstum in Gegenwart von Kanamycin“ geprüft. Um nachzuweisen, dass das deletierte argFRGH-Allel im Chromosom verblieben ist,

5 wurden ungefähr 20 Kolonien, die den Phänotyp „Wachstum in Gegenwart von Sucrose“ und „Nicht-Wachstum in Gegenwart von Kanamycin“ aufweisen, nach der Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, 1990, Academic Press) mit Hilfe der

10 Polymerase-Kettenreaktion untersucht. Hierbei wurde aus der chromosomalen DNA der Kolonien ein DNA-Fragment amplifiziert, welches die umgebenden Bereiche des deletierten argFRGH-Bereiches trägt. Es wurden die folgenden Primer-Oligonukleotide für die PCR ausgewählt.

15 argFRGH_d1 (SEQ ID NO:24):
5'-GGT GGT GCT AGC CCG GCG ATT TCT TTG CAC AT-3'

argFRGH_d4 (SEQ ID NO:27):
5'-GGT GGT ATG CAT GGT GAT GGT TCC GAA TGT TG-3'

Die Primer ermöglichen bei Kontroll-Klonen mit

20 vollständigem argFRGH-Lokus die Amplifizierung eines ca. 5,35 kb großen DNA-Fragmentes. Bei Klonen mit einem deletierten argFRGH-Lokus werden DNA-Fragmente mit einer Größe von ca. 1,04 kb amplifiziert.

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mittels

25 Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel identifiziert. Damit konnte gezeigt werden, daß der Stamm ein deletiertes argFRGH-Allel auf dem Chromosom trägt. Der Stamm wurde als Corynebacterium glutamicum Delta_argFRGH bezeichnet.

Beispiel 4:

30 Expression des lyse-Gens in Corynebacterium glutamicum ATCC 13032_Delta_argFRGH

Mittels Elektroporation (Haynes et al., FEMS Microbiology Letters (1989) 61: 329-334) wurde das Plasmid pVWEx1_Lyse und das Leerplasmid pVWEx1 in den L-Ornithin bildenden

Stamm ATCC 13032_Delta_argFGH eingebracht. Transformanten wurden anhand ihrer Kanamycinresistenz auf 25 µg/ml Kanamycin enthaltenen Caso-Agarplatten identifiziert. 5 Einzelklone wurden im Anschluss auf Korrektheit des transformierten Plasmides geprüft. Dazu wurde Plasmid-DNA isoliert (Plasmid Isolation Kit, Qiagen) und diese DNA durch Restriktionsanalyse auf das korrekte Spaltungsmuster überprüft. Auf diese Weise entstanden die C. glutamicum Stämme ATCC 13032_Delta_argFRGH/pVWEx1_lyeE und ATCC 10 13032_Delta_argFRGH/pVWEx1.

Beispiel 5:

Herstellung von L-Ornithin mit *Corynebacterium glutamicum*

Zur Untersuchung ihrer Fähigkeit L-Ornithin zu produzieren wurden jeweils drei Klone des Stammes ATCC 15 13032_Delta_argFRGH/pVWEx1_lyeE und drei Klone des Stammes ATCC 13032_Delta_argFRGH/pVWEx1 in jeweils 10 ml Testmedium für 16 h bei 33°C vorkultiviert. Für den Produktionstest wurden mit der erhaltenen Vorkultur je 10 ml Testmedium so angeimpft, dass die Start-OD₆₀₀ (optische Dichte bei 600 nm) 20 0,1 betrug. Jeder Klon wurde in drei Schüttelkolben geprüft, sodass jeder Stamm zum jeweiligen Erntezeitpunkt durch insgesamt neun Schüttelkolben repräsentiert ist. Das Testmedium war identisch mit dem bei Keilhauer et al. (Journal of Bacteriology (1993) 175: 5593-5603) 25 beschriebenen CgXII-Medium, enthielt aber zusätzlich 7,5 g/l Hefeextract (Difco), 25 µg/ml Kanamycin, 1 mM IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) und 40 g/l Saccharose anstelle Glucose. Der Einfachheit halber ist die Zusammensetzung des Testmediums in der nachfolgenden 30 Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2

Komponente	Gehalt pro l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20 g
Harnstoff	5 g
KH_2PO_4	1 g
K_2HPO_4	1 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,25 g
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	42 g
CaCl_2	0,01 g
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,01 g
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,01 g
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,001 g
CuSO_4	0,0002 g
$\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,00002 g
Biotin	0,0002 g
Protokatechusäure	0,03 g
Saccharose	40 g
Hefeextrakt	7,5 g
pH (mit NaOH)	7

Die Kultivierung erfolgte bei 33°C und 200 rpm in 100 ml Schüttelkolben. Die Auslenkung des Schüttlers war 5 cm.

- 5 Nach 24 und 48 Stunden wurden drei Kulturen eines Klon geerntet. Hierzu wurden Proben aus den Kulturen entnommen und die optische Dichte, der Gehalt an Saccharose und der Gehalt an L-Ornithin bestimmt. Für die Bestimmung Gehaltes an Saccharose und L-Ornithin wurden die Zellen kurz
- 10 abzentrifugiert (Tischzentrifuge Typ 5415D (Eppendorf) bei 13000 rpm, 10 min, Raumtemperatur).

- Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte bei einer Wellenlänge von 660 nm mit einem GENios Mikrotiterplatten Photometer (Tecan, Reading UK). Die Proben wurden vor der
- 15 Messung 1:100 mit demineralisiertem Wasser verdünnt.

- Die Bestimmung der Saccharose erfolgte mit einem Testsystem (Cat. Nr. 10 716 251 035) der Firma R-Biopharm AG
- 20 (Darmstadt, Deutschland). Hierbei wird Saccharose invertiert und die gebildete Glukose mit einem gekoppeltem

Enzymtest (Hexokinase/Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase) via NADH-Bildung nachgewiesen.

Die quantitative Bestimmung der extrazellulären
5 Aminosäurekonzentrationen aus dem Kulturüberstand erfolgte mittels reversed phase HPLC (Lindroth et al., Analytical chemistry (1979) 51: 1167-1174). Es wurde ein HPLC-Gerät der Serie HP1100 (Hewlett-Packard, Waldbronn, Deutschland) mit angeschlossenem Fluoreszenzdetektor (G1321A) verwendet;
10 die Systemsteuerung und die Auswertung der Daten erfolgte mit einer HP-Chem-Station (Hewlett-Packard). 1 µL der zu analysierenden Aminosäurelösung wurde in einer automatischen Vorsäulenderivatisierung mit 20 µL ortho-Phthalaldehyd/2-Mercaptoethanol-Fertigreagenz (Pierce
15 Europe BV, Oud-Beijerland, Niederlande) gemischt. Die dabei entstehenden fluoreszierenden, thiosubstituierten Isoindole (Jones et al., Journal of Chromatography (1983) 266: 471-482) wurden über eine kombinierte Vorsäule (40x4 mm Hypersil ODS 5) und Hauptsäule (Hypersil ODS 5, beide
20 Säulen von der Firma CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Deutschland) mit einem Gradientenprogramm mit zunehmend unpolarer Phase (Methanol) aufgetrennt. Das polare Eluent war Natriumacetat (0,1 M; pH 7,2); die Flußrate betrug 0,8 mL pro Minute. Die Fluoreszenzdetektion
25 der derivatisierten Aminosäuren erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 230 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm. Die L-Ornithin bzw. die L-Ornithinhydrochlorid Konzentrationen wurden durch einen Vergleich mit einem externen Standard und L-Asparagin als
30 zusätzlichen internen Standard berechnet.

Das Molekulargewicht von L-Ornithinhydrochlorid beträgt 168,6 g x mol⁻¹ und von L-Ornithin 132,1 g x mol⁻¹.

Zur Berechnung der Ausbeute wurde die Menge an gebildetem L-Ornithin (gemessen als L-Ornithinhydrochlorid) durch die
35 Menge an verbrauchter Saccharose geteilt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: L-Ornithin Bildung nach 24 Stunden (Tabelle 3A) und 48 Stunden (Tabelle 3B) Inkubation. Abkürzungen: *: ATCC 13032 Δ Delta_argFRGH; Orn-HCl: L-Ornithinhydrochlorid.

Tabelle 3A:

Zeit	24 Stunden		
Stamm	Orn-HCl	Ausbeute	OD
	g/l	g/g	
*/pVWEx1	9,83 $\pm$ 0,10	0,39 $\pm$ 0,01	10,78 $\pm$ 0,30
*/pVWEx1_lyse	13,03 $\pm$ 0,16	0,44 $\pm$ 0,01	10,40 $\pm$ 0,41

5

Tabelle 3B:

Zeit	48 Stunden		
Stamm	Orn-HCl	Ausbeute	OD
	g/l	g/g	
*/pVWEx1	15,50 $\pm$ 0,74	0,36 $\pm$ 0,01	11,69 $\pm$ 1,40
*/pVWEx1_lyse	18,48 $\pm$ 0,51	0,42 $\pm$ 0,01	9,18 $\pm$ 0,48

Beispiel 6: Sequenzierung und Hinterlegung des Plasmides pEC7lyse

- 10 Das Plasmid pEC7lyse wurde von Dr. Lothar Eggeling (Forschungszentrum Jülich GmbH, D-52425 Jülich), dem Korrespondenzautor der Veröffentlichung Bellmann et al. (Microbiology (2001) 147,1765-1774), in Form einer wässrigen Lösung zur Verfügung gestellt.
- 15 Von der erhaltenen DNA-Lösung wurde ein Aliquot zur Transformation kompetenter Escherichia coli Zellen des Stammes DH5alpha (subcloning efficiency, Genotyp: F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-,

mK+) *phoA supE44* λ - *thi-1 gyrA96 relA1*) der Firma Invitrogen GmbH (Paisley, UK) nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf Luria-Bertani-Agar, der mit 50 μ g/ml Kanamycin
5 supplementiert worden war.

Eine Transformante wurde als *Escherichia coli* DH5alpha/pEC7lyse(DM2204) bezeichnet und am 15. Januar 2010 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Deutschland) unter der
10 Hinterlegungsnummer DSM 23239 nach Budapester Vertrag hinterlegt.

Im Rahmen einer Auftragssequenzierung (Walking Service) bei der Firma Eurofins MWG Operon GmbH (Martinsried, Deutschland) wurde das Plasmid pEC7lyse aus Stamm DSM 23239
15 vollständig sequenziert. Die Sequenz von pEC7lyse ist als SEQ ID NO:29 angegeben.

PCT

Ausdruck (Original in elektronischem Format)

(Dieses Blatt zählt nicht als Blatt der internationalen Anmeldung und ist nicht Teil derselben)

0-1	Formular PCT/RO/134 (SAFE) Angaben zu einem hinterlegten Mikroorganismus und/oder anderem hinterlegten biologischen Material	
0-1-1	Erstellt mit	PCT Online Filing Version 3.5.000.221 MT/FOP 20020701/0.20.5.9
0-2	Internationales Aktenzeichen	PCT/EP2011/054541
0-3	Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	2009P00319WO

1	Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus und/ oder anderes biologisches Material, der/das in der Beschreibung genannt ist	
1-1	Seite	40
1-2	Zeile	12–16
1-3	Angaben betr. Hinterlegung	
1-3-1	Name der Hinterlegungsstelle	DSMZ DSMZ–Deutsche Sammlung von Mikroor- ganismen und Zellkulturen GmbH
1-3-2	Anschrift der Hinterlegungsstelle	Inhoffenstr. 7B, D–38124 Braunschweig, Germany
1-3-3	Datum der Hinterlegung	15. Januar 2010 (15.01.2010)
1-3-4	Eingangsnummer	DSMZ 23239
1-5	Bestimmungsstaaten, für die besondere Angaben gemacht werden	Alle Bestimmungsstaaten

VOM ANMELDEAMT AUSZUFÜLLEN

0-4	Dieses Formular ist mit der interna- tionalen Anmeldung eingegangen (ja oder nein)	ja
0-4-1	Bevollmächtigter Bediensteter	Gorge, Olivier

VOM INTERNATIONALEN BÜRO AUSZUFÜLLEN

0-5	Dieses Formular ist an folgendem Datum beim internationalen Büro eingegangen	
0-5-1	Bevollmächtigter Bediensteter	

Ansprüche

- 1) Verfahren zur Herstellung von L-Ornithin, dadurch gekennzeichnet, dass man folgende Schritte durchführt
- 5 a) Fermentation eines L-Ornithin ausscheidenden Bakteriums, ausgewählt aus der Gruppe Corynebacterium, Bacillus, Streptomyces, Arthrobacter und der Enterobacteriaceae, in dem ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, welches die Aktivität eines L-Ornithin-Exporters hat und dessen Aminosäuresequenz $\geq 35\%$,
10 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2, überexprimiert vorliegt, in einem Medium
- b) Akkumulation des L-Ornithins in dem Medium, wobei eine Fermentationsbrühe erhalten wird, und
- 15 c) wobei für die Überexpression das Plasmid pEC7lyse hinterlegt in DSM23239 ausgeschlossen wird,
- d) und wobei gegebenenfalls die Länge des kodierten Polypeptids ≥ 146 bis ≤ 286 von Aminosäuren bzw. Aminosäureresten beträgt.
- 20 2) Das Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das kodierte Polypeptid die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:4 umfasst.
- 3) Das Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass im Falle von Corynebacterium glutamicum durch die Überexpression die Höhe der L-Ornithin Exportaktivität um mindestens 10% erhöht
25 vorliegt im Vergleich zu ATCC13032 oder ATCC14067 oder ATCC13869.

- 4) Das Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Überexpression durch eine oder mehrere der Maßnahmen erzielt wird ausgewählt aus der Gruppe
- 5 a) Erhöhung der Kopienzahl,
- b) Verwendung eines starken Promotors, und
- c) Mutation des Promotors, und
- d) Überexpression eines Aktivatorproteins.
- 5) Das Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Bakterium um Corynebacterium, bevorzugt Corynebacterium glutamicum handelt.
- 6) Das Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass man zusätzlich eines oder mehrere der Gene ausgewählt aus der Gruppe
- a) odhA-Gen, das für die E1-Untereinheit der alpha-Ketoglutarat-Dehydrogenase (EC 1.2.4.2) kodiert,
- b) sucA-Gen, das für die Dihydrolipoamide Succinyltransferase (EC 2.3.1.61) kodiert,
- c) dapA-Gen, das für eine Dihydrodipicolinat-Synthase (DapA, EC 4.2.1.52) kodiert,
- d) dapB-Gen, das für eine Dihydrodipicolinat-Synthase (DapB, EC 1.3.1.26) kodiert,
- e) ddh-Gen, das für eine meso-Diaminopimelat Dehydrogenase (Ddh, EC 1.4.1.16) kodiert,
- f) lysA-Gen, das für eine Diaminopimelat-Decarboxylase (LysA, EC 4.1.1.20) kodiert,

- g) argR-Gen, das für einen/den Repressor (ArgR) der Biosynthese von L-Arginin kodiert,
- h) argF-Gen, das für eine Ornitin Carbamoyl Transferase (ArgF, EC 2.1.3.3) kodiert,
- 5 i) argG-Gen, das für eine Argininosuccinat Synthase (ArgG, EC 6.3.4.5) kodiert,
- j) argH-Gen, das für eine Argininosuccinat Lyase (ASAL) (ArgH, EC 4.3.2.1) kodiert,
- 10 k) lysC-Gen, das für eine Aspartatkinase (LysC, EC 2.7.2.4) kodiert, und
- l) asd-Gen, das für eine Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase (Asd, EC 1.2.1.11) kodiert.
- abschwächt.
- 7) Das Verfahren nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass man zusätzlich eines oder mehrere der Gene ausgewählt aus der Gruppe
- 15 a) Glutamat-Dehydrogenase (EC 1.4.1.3) kodiert vom gdh-Gen,
- b) Glutamat N-Acetyltransferase (EC 2.3.1.35 und EC 2.3.1.1) kodiert vom argJ-Gen,
- 20 c) Acetylglutamatkinase (EC 2.7.2.8) kodiert vom argB-Gen,
- d) N-Acetyl-Gamma-Glutamyl-Phosphat-Reduktase (EC 1.2.1.38) kodiert vom argC-Gen,
- 25 e) Acetyl-Ornithin Aminotransferase (EC 2.6.1.11), kodiert vom argD-Gen,

- f) Glukose spezifische Komponente EIIB (PtsG) (EC 2.7.1.69) des Glukose-Aufnahmesystems kodiert vom ptsG-Gen,
- 5 g) Saccharose spezifische Komponente EIIB (PtsS) (EC 2.7.1.69) des Saccharose-Aufnahmesystems kodiert vom ptsS-Gen,
- h) Glucose-6-Phosphat 1- Dehydrogenase (EC 1.1.1.49) kodiert vom zwf-Gen,
- 10 i) Glucose-6-Phosphat-Isomerase (EC 5.3.1.9) kodiert vom pgi-Gen,
- j) Phosphofructokinase (EC 2.7.1.11) kodiert vom pfkA-Gen,
- k) Fructose-bisphosphat aldolase (EC 4.1.2.13) kodiert vom fda-Gen,
- 15 l) Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (EC 1.2.1.59), kodiert vom gap-Gen,
- m) Phosphoglycerat Kinase (EC 2.7.2.3) kodiert vom pgk-Gen,
- n) Pyruvatkinase (EC 2.7.1.40) kodiert vom pyk-Gen,
- 20 o) E1-Untereinheit der Pyruvat-Dehydrogenase (EC 1.2.4.1) kodiert vom aceE-Gen,
- p) Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (EC 4.1.1.31) kodiert vom ppc-Gen,
- 25 q) Pyruvat-Carboxylase (EC 6.4.1.1), kodiert vom pyc-Gen,
- r) Aconitase (EC 4.2.1.3) kodiert vom acn-Gen, und
- s) Isocitrat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.42) kodiert vom icd-Gen

verstärkt.

- 8) Das Verfahren nach Anspruch 1 bis 7 dadurch gekennzeichnet, dass es sich um ein Verfahren ausgewählt aus der Gruppe Satzverfahren, Zulaufverfahren, repetitives Zulaufverfahren und kontinuierliches Verfahren handelt.
- 9) Das Verfahren nach Anspruch 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass man aus der L-Ornithin haltigen Fermentationsbrühe L-Ornithin oder ein flüssiges oder festes L-Ornithin-haltiges Produkt gewinnt.