



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 105**

51 Int. Cl.:

C12N 15/52 (2006.01)

C07K 14/34 (2006.01)

C12R 1/15 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05822785 .1**

96 Fecha de presentación : **13.12.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1828384**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.09.2007**

54 Título: **Mutante del gen proB de las bacterias corineformes.**

30 Prioridad: **22.12.2004 DE 10 2004 061 696**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.06.2011

73 Titular/es: **Evonik Degussa GmbH**
Rellinghauser Strasse 1-11
45128 Essen, DE

72 Inventor/es: **Hans, Stephan;**
Bathe, Brigitte y
Thierbach, Georg

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 362 105 T3

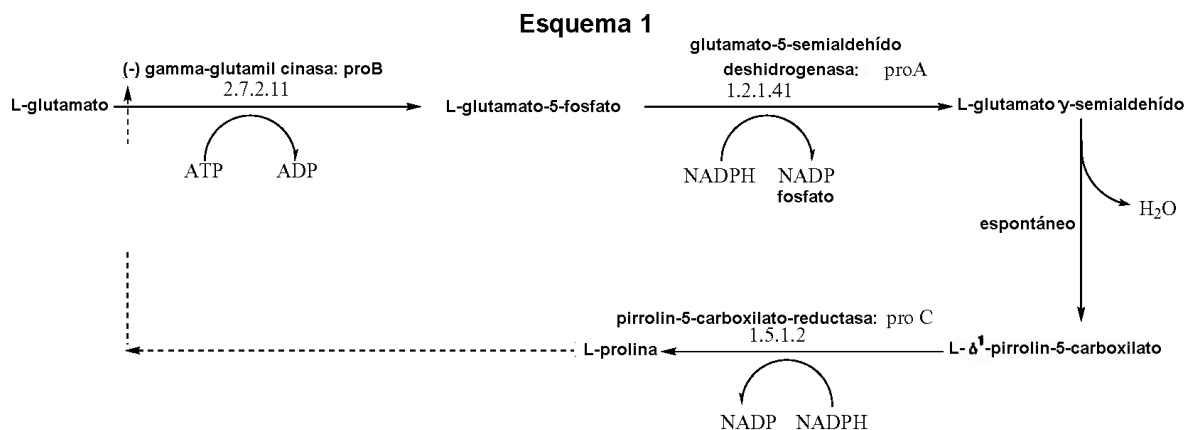
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Mutante del gen proB de las bacterias corineformes

La presente invención se refiere a una enzima que tiene actividad de γ -glutamil cinasa. Más particularmente, la presente invención caracteriza a aquellas enzimas que tienen un aminoácido proteinogénico distinto de glicina en la posición 149 de la secuencia de aminoácidos.

Las enzimas que tienen actividad de γ -glutamil cinasa se emplean preferiblemente en la producción por fermentación de L-prolina. En el esquema 1 se representa la ruta biosintética de la L-prolina, partiendo de glutamato.



Es sabido que los aminoácidos se pueden producir fermentando cepas de, por ejemplo, bacterias corineformes, en particular *Corynebacterium glutamicum*. Debido a la gran importancia, se están realizando constantemente esfuerzos para mejorar los procesos de producción. Las mejoras en el procedimiento pueden implicar medidas de relacionadas con la tecnología de la fermentación, tales como, por ejemplo, la agitación y el suministro de oxígeno, o la composición de los medios nutrientes, tal como, por ejemplo, la concentración de azúcar durante la fermentación, o el tratamiento hasta obtener la forma del producto, por ejemplo por medio de cromatografía de intercambio iónico, o las propiedades intrínsecas de comportamiento del microorganismo propiamente dicho.

Las propiedades de comportamiento de estos microorganismos se mejoran aplicando métodos de mutagénesis, selección y elección de mutantes. Esto da como resultado cepas que son resistentes a antimetabolitos o son auxótrofas para metabolitos importantes para la regulación y que producen aminoácidos. Un antimetabolito conocido es el análogo de prolina 3,4-deshidro-DL-prolina (DHP).

Desde hace varios años se han empleado igualmente métodos de ADN recombinante para mejorar las cepas de *Corynebacterium* que producen L-aminoácidos, amplificando genes de la biosíntesis de aminoácidos individuales e investigando el efecto sobre la producción de aminoácidos.

La secuencia nucleotídica del genoma de *Corynebacterium glutamicum* se describe, entre otros, en el documento EP-A-1108790, y también se ha depositado en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) de la National Library of Medicine (Bethesda, MD, USA) con los números de acceso NC_003450.2 y BX927148.1 a BX927157.1.

Sleator et al. dan a conocer la posibilidad de provocar sobreproducción en la biosíntesis de prolina mutando el gen proB de *Listeria monocytogenes* (Appl. Environ. Microbiol. 2001, 67, 4560-5). Las mutaciones especificadas allí y declaradas como exitosas implican genes de proB que codifican γ -glutamil cinasas que tienen las siguientes mutaciones: V121I, A144V y E146K. Además, se hace mención al hecho de que las regiones en las que se producen estas mutaciones corresponden muy bien a la región también identificada en otros organismos como una región diana para mutaciones ventajosas.

Por lo tanto, fue el objeto de la presente invención hacer que estén disponibles otras variantes proteicas mutadas y, cuando sea apropiado, mejoradas de una γ -glutamil cinasa, que se pueden emplear ventajosamente en un proceso técnico para la producción de L-prolina por fermentación.

Este objeto y otros objetos que no se especifican con detalle pero que surgen de manera obvia a partir de la técnica anterior se logran partiendo de las γ -glutamil cinasas de la reivindicación 1. La reivindicación 2 se centra en enzimas preferidas de este tipo. La reivindicación 3 y 4 se refiere a las secuencias nucleotídicas que codifican estas enzimas, respectivamente, mientras que la reivindicación 5 se centra en vehículos producidos de forma recombinante que

tienen las secuencias nucleotídicas recién mencionadas. Finalmente, la reivindicación 5 se refiere a un proceso de producción según la invención para la L-prolina con la ayuda de las enzimas mencionadas.

Proporcionando una γ -glutamil cinasa (producto del gen proB) que tiene un aminoácido proteinogénico distinto de glicina en la posición 149 de los aminoácidos, sorprendentemente, aunque no menos ventajosamente, se logra de forma particular el objeto expuesto. En comparación con las enzimas de tipo salvaje, las γ -glutamil cinasas que tienen una mutación apropiada ayudan a producir L-prolina de manera mejorada en un proceso de producción por fermentación. Usando los métodos según la invención, es posible mejorar el comportamiento de los organismos hospedantes o del proceso de fermentación con respecto a uno o más de los parámetros seleccionados del grupo de concentración de producto (producto por volumen), rendimiento de producto (producto formado por fuente de carbono consumida) y formación de producto (producto formado por volumen y tiempo), o cualesquiera otros parámetros del proceso y sus combinaciones en al menos 0,5%, al menos 1%, al menos 1,5% o al menos 2%, basándose en la cepa de partida o cepa progenitora o el proceso de fermentación con el uso de dichas enzimas.

Se da preferencia a proporcionar γ -glutamil cinasas en las que un aminoácido, preferiblemente el L-aminoácido, seleccionado del grupo que consiste en Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys o Phe está presente en la posición del aminoácido como se define según la invención. (Los aminoácidos mencionados, incluyendo glicina, también se denominan en la técnica como aminoácidos proteinogénicos). Se da una preferencia muy particular a la sustitución de glicina con ácido L-aspártico en la posición 149 (G149D) en la mencionada enzima. Se da la máxima preferencia a una γ -glutamil cinasa según la invención, como se especifica anteriormente, que tiene una longitud de 369 ± 40 , preferiblemente ± 20 , más preferiblemente ± 10 y preferiblemente de forma muy particular ± 5 aminoácido o ± 3 aminoácidos. Se sabe que las enzimas intrínsecas al hospedante, denominadas aminopeptidasas, son capaces de escindir el aminoácido N-terminal metionina, separándolo de la proteína formada. Además, se sabe que la escisión de uno (1) o dos (2) y de no más de tres (3) aminoácidos del término C de la proteína altera la actividad enzimática sólo de forma insignificante como mucho, si es que lo hace. Sin embargo, la enzima puede aumentar en longitud debido a la anexión de ciertas proteínas de fusión (véase más abajo).

La presente invención también engloba la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2, preferiblemente 4, o una secuencia que es al menos 90% idéntica a ella, comprendiendo las secuencias la sustitución de aminoácidos de glicina por otro aminoácido, en particular cualquiera de los aminoácidos preferidos mencionados, en la posición 149. De este modo, la invención también engloba aquellas enzimas que tienen los grados mencionados anteriormente de identidad a nivel de aminoácidos en comparación con SEC ID NO: 2, preferiblemente 4. Igualmente, estas enzimas se pueden originar a partir de fuentes naturales. Como alternativa, se pueden haber modificado mediante tecnología de ADN recombinante, de tal manera que el experto puede predecir la actividad enzimática a retener o esencialmente retenida (véase, por ejemplo, Sambrook et al, "Molecular Cloning, A Laboratory Handbook", 2ª edición 1989, CSH Press, Cold Spring Harbor, Ausubel et al. "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, NY 2001). De este modo, los aminoácidos que no están presentes en el sitio activo y cuya sustitución por un aminoácido "del mismo tipo" no se espera que dé como resultado, a primera vista, una estructura tridimensional sustancialmente alterada se pueden sustituir por un aminoácido "del mismo tipo". Por ejemplo, se puede esperar que ciertos aminoácidos con cadenas laterales no polares (aminoácidos del mismo tipo) se puedan sustituir, por ejemplo isoleucina por valina, sin que esto tenga una influencia (sustancial) sobre la función biológica o enzimática de la enzima según la invención, o sobre la actividad enzimática. El experto puede alcanzar, basándose en su conocimiento, conclusiones correspondientes también para la sustitución de otros tipos de aminoácidos (por ejemplo la sustitución de aminoácidos básicos por otros aminoácidos básicos, o de aminoácidos con cadenas laterales polares no cargadas por otros aminoácidos de este grupo).

Igualmente se da preferencia a una γ -glutamil cinasa que tiene al menos la secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 145 a 154, más preferiblemente 130 a 169, y preferiblemente de forma muy particular 110 a 189 de SEC ID NO: 2, preferiblemente 4, siendo posible que la longitud de la secuencia de aminoácidos de γ -glutamil cinasa corresponda a los números indicados anteriormente.

Las enzimas según la descripción comprenden adicionalmente al menos una sección de aminoácidos heteróloga, por medio de la cual estos polipéptidos se caracterizan como proteínas de fusión. Los ejemplos de componentes heterólogos de la proteína de fusión según la invención pueden ser marcadores (por ejemplo marcador de His o marcador de Flag) que se pueden emplear en la purificación de las proteínas de fusión según la descripción. En otras realizaciones, los componentes heterólogos pueden tener una actividad enzimática separada. En tal caso, los dos componentes enzimáticos están conectados preferiblemente mediante un enlazador, tal como un enlazador de glicina o de glicina-serina flexible de 6-10 aminoácidos de longitud, a fin de asegurar la funcionalidad de los componentes. El término "heterólogo", como se usa aquí, puede significar, por un lado, que los componentes de la proteína de fusión no se producen de forma natural juntos en una forma enlazada covalentemente, y, por otro lado, que los componentes derivan de diferentes especies. Las proteínas de fusión se preparan habitualmente por medio de tecnología de ADN recombinante (véase Sambrook et al., en el lugar citado).

En una realización adicional, la presente invención se refiere a una secuencia nucleotídica (secuencia de ácidos nucleicos) que codifica una γ -glutamil cinasa según la invención, como se especifica anteriormente. En

consecuencia, la invención también se refiere a secuencias nucleotídicas replicables que codifican la enzima γ -glutamil cinasa, siendo posible que las secuencias de aminoácidos correspondientes codificadas por estas secuencias nucleotídicas tengan cualquier aminoácido proteinogénico, excepto glicina, en la posición 149.

5 Las secuencias nucleotídicas de la invención codifican preferiblemente una γ -glutamil cinasa, comprendiendo la secuencia de aminoácidos codificada correspondiente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys o Phe en la posición 149. Se prefiere de forma muy particular una secuencia nucleotídica que codifica una γ -glutamil cinasa que tiene un ácido L-aspartico en la posición 149.

10 La invención se refiere igualmente a secuencias de ácidos nucleicos replicables que codifican una γ -glutamil cinasa que tiene la sustitución de aminoácidos según la invención en la posición 149,

a) siendo estas secuencias idénticas a SEC ID NO: 1, preferiblemente SEC ID NO: 3, o

b) codificando estas secuencias una γ -glutamil cinasa según la invención, que tiene una longitud de 369 ± 40 aminoácidos, o

15 c) codificando estas secuencias una γ -glutamil cinasa según la invención, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2, preferiblemente SEC ID NO: 4, al menos en las posiciones 145 a 154, o

d) codificando estas secuencias una γ -glutamil cinasa según la invención, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2, preferiblemente SEC ID NO: 4, al menos en las posiciones 145 a 154 y que se hibrida en condiciones experimentales restrictivas a la secuencia nucleotídica complementaria a SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 3, o

20 f) secuencia nucleotídica replicable que codifica la enzima según la invención, γ -glutamil cinasa, cuya secuencia de bases comprende adenina en la posición 446, como se representa en SEC ID NO: 3.

El alcance de las reivindicaciones comprende igualmente de forma preferible secuencias de ácidos nucleicos replicables que codifican γ -glutamil cinasas según la invención, que tienen una longitud de 369 ± 20 , más preferiblemente ± 10 y muy preferiblemente ± 5 o ± 3 restos de aminoácidos.

25 La invención también se refiere a una secuencia nucleotídica como se representa en SEC ID NO: 1, preferiblemente 3. Como ya se ha mencionado, la descripción también engloba aquellas secuencias que son al menos 70% idénticas a aquella de SEC ID NO: 3 a nivel nucleotídico. Un ejemplo de una secuencia nucleotídica que es al menos 70% idéntica a aquella de SEC ID NO: 3 se muestra en SEC ID NO: 5. SEC ID NO: 6 muestra la secuencia de aminoácidos de γ -glutamil cinasa, codificada por SEC ID NO: 5.

30 La invención se refiere igualmente a secuencias de ácidos nucleicos replicables que codifican γ -glutamil cinasas que incluyen preferiblemente al menos la secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 130-169, y muy particularmente de forma preferible las posiciones 110 a 189 de SEC ID NO: 2, preferiblemente 4, y que se hibrida en condiciones experimentales restrictivas con la secuencia nucleotídica complementaria SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 3.

35 El término "complementaria" significa, según la invención, que la complementariedad se extiende sin saltos a lo largo de toda la región de la molécula de ácido nucleico según la invención. En otras palabras, según la invención, se da preferencia a una complementariedad que se extiende 100% a lo largo de toda la región de la secuencia según la invención, es decir, desde el término 5' representado al término 3' representado, en particular las regiones codificantes (cds). En otras realizaciones preferidas, la complementariedad se extiende a lo largo de una región de al
40 menos 19, preferiblemente al menos 21, nucleótidos sucesivos que preferiblemente no codifican el sitio activo de actividad enzimática.

Se da preferencia a aquellas secuencias de ácidos nucleicos derivadas de las bacterias corineformes, preferiblemente *Corynebacterium glutamicum*. Las secuencias de ácidos nucleicos de genes o alelos, que están presentes en la población de una especie, también se denominan en la técnica como genes o alelos endógenos.

45 La presente invención se refiere además a vehículos recombinantes (rec) que tienen las secuencias nucleotídicas según la invención. Los vehículos adecuados son cualesquiera realizaciones consideradas para este fin por el experto, en particular vectores y organismos hospedantes.

Los ejemplos de organismos hospedantes que se pueden mencionar a este respecto son levaduras tales como *Hansenula polymorpha*, *Pichia sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, procariontes tales como *E. coli*, *Bacillus subtilis*,
50 bacterias corineformes tales como *Corynebacterium glutamicum*, o eucariotas tales como células de mamíferos, células de insectos o células vegetales. Estos organismos acumulan, cuando sea apropiado ya antes de las medidas de la presente invención, L-prolina en sus células o en el medio de fermentación que las rodea. De este modo, en esta realización preferida, el hospedante según la invención es una célula recombinante que se ha transformado o transfectado con una secuencia de ácidos nucleicos según la invención o un vector según la invención (véase más

abajo), o se ha proporcionado con ellos por medio de conjugación (los términos “transformación”, “transfección” y “conjugación” se usan de forma sinónima según la presente invención). La transformación y transfección, respectivamente, se pueden llevar a cabo según métodos conocidos, por ejemplo por medio de coprecipitación con fosfato de calcio, lipofección, electroporación, bombardeo con partículas o infección vírica. La célula según la invención puede contener el ácido nucleico recombinante extracromosómicamente, o en una forma integrada cromosómicamente. En otras palabras, la transfección/transformación puede ser una estable o una transitoria. Los procesos para la clonación son bien conocidos por el experto (Sambrook, J.; Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989), *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York). Las cepas de *E. coli* se pueden utilizar para la preparación recombinante y métodos de mutagénesis, que incluyen entre otras: *E. coli* XL1 Blue, NM 522, JM101, JM109, JM105, RR1, DH5 α , TOP10, HB101, BL21 codon plus, BL21 (DE3) codon plus, BL21, BL21 (DE3), MM294. Igualmente, los plásmidos usados entre otros para la clonación del constructo génico que tiene el ácido nucleico según la invención en el organismo hospedante son conocidos por el experto (véase también el documento PCT/EP03/07148; véase más abajo).

Un hospedante del género *Corynebacterium*, del cual se puede hacer mención particular, es la especie *Corynebacterium glutamicum* que es conocido en la técnica. Los ejemplos de cepas de tipo salvaje conocidas del género *Corynebacterium* son:

Corynebacterium glutamicum ATCC13032

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870

Corynebacterium efficiens DSM 44549

Corynebacterium melassecola ATCC17965

Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539

Brevibacterium flavum ATCC14067

Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 y

Brevibacterium divaricatum ATCC14020.

La información relativa a la clasificación taxonómica de cepas de este grupo de bacterias se puede encontrar, entre otros, en Kämpfer y Kroppenstedt (*Canadian Journal of Microbiology* 42, 989-1005 (1996)) y en el documento US-A-5.250.434. Desde hace ya algunos años (Liebl et al., *International Journal of Systematic Bacteriology* 41(2), 255-260 (1991)), las bacterias corineformes con los nombres de especies “*Brevibacterium flavum*”, “*Brevibacterium lactofermentum*” y “*Brevibacterium divaricatum*” se han clasificado bajo la especie *Corynebacterium glutamicum*. Igualmente, las bacterias corineformes con el nombre de especie “*Corynebacterium melassecola*” pertenecen a la especie *Corynebacterium glutamicum*.

Los ejemplos de cepas de bacterias corineformes productoras de L-prolina son las cepas:

Brevibacterium lactofermentum NRRL B-11421,

Brevibacterium flavum NRRL B-11422,

Corynebacterium glutamicum NRRL B-11423,

Microbacterium ammoniaphilum NRRL B-11424,

Corynebacterium glutamicum ATCC 21157,

Corynebacterium glutamicum ATCC 21158,

Corynebacterium glutamicum ATCC 21159,

Corynebacterium glutamicum ATCC 21355,

Corynebacterium acetophilum FERM-P 4045,

Corynebacterium acetoacidophilum FERM-P 4962,

Arthrobacter citreus FERM-P 4963, y

Microbacterium ammoniaphilum FERM-P 4964,

todas las cuales se describen en los documentos US 4.224.409 y US 4.444.885.

En los vectores según la invención, las secuencias de ácidos nucleicos según la invención están preferiblemente enlazadas de forma operativa a una secuencia de control de la expresión para que se puedan transcribir y, cuando sea apropiado, traducir en una célula hospedante adecuada. Las secuencias de control de la expresión comprenden habitualmente un promotor y, cuando sea apropiado, otras secuencias reguladoras tales como operadores o potenciadores. Además, también es posible que estén presentes secuencias de iniciación de la traducción. El experto en la técnica conoce secuencias de control de la expresión adecuadas para células hospedantes procariotas o eucariotas (véase, por ejemplo, Sambrook et al., en el lugar citado). El vector recombinante según la invención puede además incluir también elementos habituales tales como un origen de la replicación y un gen marcador de selección. Los ejemplos de vectores recombinantes adecuados son plásmidos, cósmidos, fagos, o virus (véase, por ejemplo, Sambrook et al., más arriba).

Los plásmidos adecuados son en principio cualesquiera realizaciones disponibles para este fin al experto. Tales plásmidos se pueden encontrar, por ejemplo, en la publicación de Studier y colaboradores (Studier, W. F.; Rosenberg A. H.; Dunn J. J.; Dubendorff J. W.; (1990), Use of the T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, *Methods Enzymol.* 185, 61-89) o en los folletos de Novagen, Promega, New England Biolabs, Clontech o Gibco BRL. Otros plásmidos y vectores preferidos se pueden encontrar en: Glover, D. M. (1985), *DNA cloning: a practical approach*, Vol. I-III, IRL Press Ltd., Oxford; Rodriguez, R.L. y Denhardt, D. T (eds) (1988), *Vectors: a survey of molecular cloning vectors and their uses*, 179-204, Butterworth, Stoneham; Goeddel, D. V. (1990), *Systems for heterologous gene expression*, *Methods Enzymol.* 185, 3-7; Sambrook, J.; Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989), *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.

Los plásmidos que se pueden usar para clonar en el organismo hospedante los constructos génicos que tienen las secuencias de ácidos nucleicos contempladas son o se basan en, de una manera muy particularmente preferida: pUC18/19 (Roche Biochemicals), pKK-177-3H (Roche Biochemicals), pBTac2 (Roche Biochemicals), pCR (Invitrogen), pKK223-3 (Amersham Pharmacia Biotech), pKK-233-3 (Stratagene) o pET (Novagen). Otros plásmidos preferidos son pBR322 (DSM3879), pACYC184 (DSM4439) y pSC101 (DSM6202), todos los cuales se pueden obtener de la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Brunswick, Alemania. Los ejemplos de promotores preferidos son el promotor T7, el promotor lac, el promotor tac, el promotor trp, el promotor rha y el promotor ara.

Preferiblemente, las γ -glutamil cinasas según la invención, o los ácidos nucleicos que las codifican, se sobreexpresan en bacterias corineformes, preferiblemente del género *Corynebacterium*, particularmente de forma preferible de la especie *Corynebacterium glutamicum*.

Sobreexpresión significa un incremento en la concentración intracelular o actividad de las γ -glutamil cinasas según la invención.

Las medidas de la sobreexpresión incrementan la actividad o concentración de la proteína correspondiente habitualmente en al menos 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% o 500%, hasta un máximo de 1000% o 2000%, basado en la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo de partida.

La sobreexpresión se puede lograr incrementando el número de copias de los genes o alelos según la invención en al menos una (1) copia, o mutando la región promotora y la región reguladora o el sitio de unión a ribosoma, que está situado en dirección 5' del gen estructural. Los casetes de expresión incorporados en dirección 5' del gen estructural actúan de la misma manera. Además, los promotores inducibles hacen posible incrementar la expresión durante la producción de L-prolina por fermentación. Las medidas para extender la duración del ARNm mejoran igualmente la expresión. Además, la actividad enzimática se amplifica evitando la degradación de la proteína enzimática. Los genes o constructos génicos pueden estar presentes en plásmidos con diferentes números de copias o en el cromosoma en una forma integrada y amplificada. Como alternativa, los genes en cuestión se pueden sobreexpresar además alterando la composición del medio y el proceso de cultivo.

Los plásmidos que se replican en bacterias corineformes son útiles para incrementar el número de copias de los alelos de proB según la invención. Numerosos vectores plasmídicos conocidos, tales como, por ejemplo, pZ1 (Menkel et al., *Applied and Environmental Microbiology* (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., *Gene* 102:93-98 (1991)) o pHS2-1 (Sonnen et al., *Gene* 107:69-74 (1991)) se basan en los plásmidos crípticos pHM1519, pBL1 o pGA1. De la misma manera, se pueden usar otros vectores plasmídicos, tales como, por ejemplo, los basados en pCG4 (documento US-A 4.489.160), o pNG2 (Serwold-Davis et al., *FEMS Microbiology Letters* 66, 119-124 (1990)) o pAG1 (documento US-A 5.158.891). En Tauch et al. (*Journal of Biotechnology* 104(1-3), 27-40 (2003)) se puede encontrar un repaso sobre vectores plasmídicos de *Corynebacterium glutamicum*.

Además es posible incrementar el número de copias aplicando el método de amplificación génica cromosómica que se ha descrito, por ejemplo, por Reinscheid et al. (*Applied and Environmental Microbiology* 60, 126-132 (1994)) en el contexto de la duplicación y amplificación del operón hom-thrB. Este método implica clonar el gen o alelo completo en un vector plasmídico que se puede replicar en un hospedante (típicamente *E. coli*) pero no en *C. glutamicum*. Los ejemplos de vectores adecuados son pSUP301 (Simon et al., *Bio/Technology* 1, 784-791 (1983)), pK18mob o

5 pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega Corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman, Journal of Biological Chemistry 269:32678-84 (1994); documento US-A 5.487.993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Países Bajos; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al., Journal of Bacteriology 173: 4510-4516 (1991)) o pBGS8 (Spratt et al., Gene 41: 337-342 (1986)). El vector plasmídico que contiene el gen o alelo a amplificar se transfiere subsiguientemente por medio de conjugación o transformación a la cepa de *C. glutamicum* deseada. El método de conjugación se describe en Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)), por ejemplo. Los métodos de transformación se describen en Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican y Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) y Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)), por ejemplo. Después de la recombinación homóloga por medio de un suceso de "entrecruzamiento genético", la cepa resultante contiene al menos dos copias del gen o alelo en cuestión. A fin de incrementar el número de copias en al menos 1, 2 ó 3, también es posible en particular usar el método de amplificación en tándem, como se describe en el documento WO 03/014330, o el método de amplificación por medio de integración en una localización deseada, como se describe en el documento WO 03/040373.

15 Los métodos de mutagénesis descritos en la técnica anterior se usan para generar la sustitución de aminoácidos según la invención en γ -glutamil cinasas (por ejemplo SEC ID NO: 2) y otras mutaciones de proB según la invención, caracterizados por una sustitución de aminoácidos en la posición 149. Los métodos de mutagénesis adecuados son cualesquiera métodos disponibles para este fin para el experto.

20 Para la mutagénesis, se pueden usar métodos de mutagénesis in vivo clásicos que usan sustancias mutagénicas tales como, por ejemplo, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) o luz ultravioleta. Las células mutagenizadas se aplican subsiguientemente, cuando sea apropiado, a un agar mínimo que contiene 3,4-deshidro-DL-prolina a concentraciones de aprox. 0,5-1 g/l, aprox. 1-2 g/l o aprox. 2-3 g/l. Los mutantes individuales se aíslan, y la secuencia nucleotídica del gen o alelo proB se determina, cuando sea apropiado, después de un proceso de clonación previo.

25 Además, es posible usar para la mutagénesis métodos in vitro tales como, por ejemplo, el tratamiento con hidroxilamina (Miller, J. H.: A Short Course in Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1992) u oligonucleótidos mutagénicos (T. A. Brown: Gentechnologie für Einsteiger [ingeniería genética para principiantes], Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1993; libro de texto por Knippers ("Molekulare Genetik" [genética molecular], 6ª edición, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Alemania, 1995); Winnacker ("Gene und Klone" [genes y clones], VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1990); Hagemann ("Allgemeine Genetik" [genética general], Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Alemania, 1986)) o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como se describe en el manual de Newton y Graham (PCR, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Alemania, 1994). Incluyen, en particular, métodos de mutagénesis de saturación, mutagénesis aleatoria, de recombinación in vitro y mutagénesis dirigida al sitio (Eigen, M. y Gardiner, W. (1984), Evolutionary molecular engineering based on RNA replication, Pure Appl. Chem. 56, 967-978; Chen, K. y Arnold, F. (1991), Enzyme engineering for nonaqueous solvents: random mutagenesis to enhance activity of subtilisin E in polar organic media. Bio/Technology 9, 1073-1077; Horwitz, M. y Loeb, L. (1986), Promoters Selected From Random DNA-Sequences, Proc Natl Acad Sci USA 83, 7405-7409; Dube, D. y L. Loeb (1989), Mutants Generated By The Insertion Of Random Oligonucleotides Into The Active-Site Of The Beta-Lactamase Gene, Biochemistry 28, 5703-5707; Stemmer, P.C. (1994), Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling, Nature 370, 389-391 y Stemmer, P.C. (1994), DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution. Proc Natl Acad Sci USA 91, 10747-10751).

45 El uso de métodos in vitro implica amplificar el gen proB descrito en la técnica anterior con la ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa, partiendo de ADN total aislado de una cepa de tipo salvaje, clonar dicho gen, cuando sea apropiado, en vectores plasmídicos adecuados, y después someter al ADN a un proceso de mutagénesis. El experto puede encontrar instrucciones sobre la amplificación de secuencias de ADN con la ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), entre otros, en el manual de Gait: Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) y en Newton y Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Alemania, 1994). De la misma manera, también es posible usar métodos de mutagénesis in vitro, como se describe, por ejemplo, en el manual bien conocido de Sambrook et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, USA, 1989). Los métodos correspondientes también están comercialmente disponibles en forma de "kits", tales como, por ejemplo, el "QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit" de Stratagene (La Jolla, USA), descrito por Papworth et al. (Strategies 9(3), 3-4 (1996)). Los mutantes de proB adecuados se seleccionan subsiguientemente y se investigan mediante los métodos descritos anteriormente.

Para la producción de L-prolina, puede ser ventajoso, además de usar las γ -glutamil cinasas según la invención, que pueden haber sido sobreexpresadas o no, sobreexpresar, además de dichas cinasas, al mismo tiempo una o más enzimas de la biosíntesis de la prolina. Habitualmente se da preferencia al uso de genes endógenos.

60 "Genes endógenos" o "secuencias nucleotídicas endógenas" significan los genes o secuencias nucleotídicas y alelos presentes en la población de una especie.

En este contexto, el término “amplificación” describe el incremento en la actividad intracelular o concentración de una o más enzimas o proteínas en un microorganismo, que son codificadas por el ADN correspondiente, por ejemplo incrementando el número de copias del gen o genes, usando un promotor potente, o usando un gen o alelo que codifica una enzima o proteína correspondiente con actividad elevada y, cuando sea apropiado, combinando estas medidas.

Las medidas de la sobreexpresión incrementan la actividad o concentración de la enzima o proteína correspondiente habitualmente en al menos 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% o 500%, hasta un máximo de 1000% o 2000%, basado en la de la proteína de tipo salvaje o en la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo de partida.

De este modo, para producir L-prolina es posible, además de usar la variante del gen proB según la invención, sobreexpresar uno o más de los genes seleccionados del grupo que consiste en

- el gen gdh que codifica glutamato deshidrogenasa (EC 1.4.1.4),
- el gen proA que codifica γ -glutamyl-fosfato reductasa (EC 1.2.1.41),
- el gen proC que codifica la pirrolin-5-carboxilato reductasa (EC 1.5.1.2), y
- el gen ocd que codifica ornitina ciclodesaminasa (EC 4.3.1.12).

Para la producción de L-prolina, adicionalmente puede ser ventajoso, además de usar mutantes según la invención del gen proB, al mismo tiempo atenuar, en particular reducir la expresión de uno o más de los genes endógenos seleccionados del grupo que consiste en

- el gen ilvA que codifica treonina desaminasa (EC 4.2.1.16),
- el gen putA que codifica prolina deshidrogenasa/pirrolin-5-carboxilato deshidrogenasa (EC 1.5.99.8),
- el gen sucA que codifica 2-cetoglutarato deshidrogenasa (EC 1.2.4.2),
- el gen sucB que codifica dihidrolipoamida succiniltransferasa (EC 2.3.1.61), y
- el gen argD que codifica acetilornitina aminotransferasa (EC 2.6.1.11).

A este respecto, el término “atenuación” describe la reducción o eliminación de la actividad intracelular o concentración de una o más enzimas o proteínas que son codificadas por el ADN correspondiente en un microorganismo usando, por ejemplo, un promotor débil, o usando un gen o alelo que codifica una enzima correspondiente con baja actividad, o inactivando el gen o enzima o proteína correspondiente, y, cuando sea apropiado, combinando estas medidas.

La atenuación se puede lograr reduciendo o eliminando la expresión de los genes o las propiedades catalíticas o reguladoras de las proteínas enzimáticas. Ambas medidas se pueden combinar cuando sea apropiado.

La expresión génica se puede reducir mediante un proceso de cultivo adecuado o mediante modificación genética (mutación) de las estructuras de las señales de la expresión génica. Los ejemplos de las estructuras de señales de la expresión génica son genes represores, genes activadores, operadores, promotores, atenuadores, sitios de unión a ribosoma, el codón de partida, y terminadores. La información sobre esto la puede encontrar el experto en, por ejemplo, la solicitud de patente WO 96/15246, en Boyd y Murphy (Journal of Bacteriology 170: 5949-5952 (1988)), en Voskuil y Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3584-3590 (1998)), en Pátek et al. (Microbiology 142: 1297-309 (1996) y Journal of Biotechnology 104: 311-323 (2003)), y en libros de texto conocidos de genética y biología molecular, tales como, por ejemplo, el libro de texto de Knippers (“Molekulare Genetik”, 6ª edición, Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Alemania, 1995), o el de Winnacker (“Gene und Klone”, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1990). Un ejemplo de la regulación específica de la expresión génica es la clonación del gen a atenuar para ponerlo bajo el control de un promotor inducible añadiendo cantidades medidas de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido), tal como, por ejemplo, el promotor trc o el promotor tac. Los vectores útiles aquí son, por ejemplo, el vector de expresión de Escherichia coli pXK99E (documento WO 0226787; depositado según el Tratado de Budapest el 31 de julio de 2001 en DH5alpha/pXK99E como DSM14440 con el Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Brunswick, Alemania)) o pVWE2 (Wendisch, tesis doctoral, Berichte des Forschungszentrums Jülich, Jül-3397, ISSN 0994-2952, Jülich, Alemania (1997)), que permiten que el gen clonado sea expresado en Corynebacterium glutamicum de una manera dependiente de IPTG.

Este método se empleó, por ejemplo, en la patente WO 02/26787 para la expresión regulada del gen deaD integrando el vector pXK99EdeaD en el genoma de Corynebacterium glutamicum, y por Simic et al. (Applied and Environmental Microbiology 68: 3321-3327 (2002)) para la expresión regulada del gen glyA mediante integración del vector pK18mobglyA' en Corynebacterium glutamicum.

- Otro método para reducir específicamente la expresión génica es la técnica antisentido, que implica introducir en las células diana oligorribonucleótidos u oligodesoxirribonucleótidos o vectores cortos para sintetizar ARN antisentido más largo. Allí, el ARN antisentido se puede unir a secciones complementarias de los ARNm específicos y reducir su estabilidad o bloquear la capacidad de traducción. Un ejemplo de esto lo puede encontrar el experto en Srivastava et al. (Applied Environmental Microbiology 2000 Oct; 66 (10): 4366 - 4371).
- Las mutaciones que dan como resultado un cambio o reducción en las propiedades catalíticas de proteínas enzimáticas son conocidas de la técnica anterior; los ejemplos que se pueden mencionar son los estudios de Qiu y Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762 (1997)) y Möckel (Tesis doctoral, Berichte des Forschungszentrums Jülich, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Alemania (1994)). Se pueden encontrar visiones generales en libros de texto conocidos de genética y biología molecular, por ejemplo el de Hagemann ("Allgemeine Genetik", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Alemania, 1986).
- Las mutaciones que reciben consideración son transiciones, transversiones, inserciones y supresiones. Dependiendo del efecto de la sustitución de aminoácidos sobre la actividad enzimática, se hace referencia a mutaciones de pérdida de sentido o a mutaciones sin sentido. Una mutación sin sentido conduce a que al menos un codón de parada esté localizado en la región codificante del gen, y que en consecuencia se termine prematuramente la traducción. Las inserciones o supresiones de al menos un par de bases en un gen conducen a mutaciones de desplazamiento del marco, como resultado de lo cual se incorporan aminoácidos incorrectos o la traducción se termina prematuramente. Las supresiones de uno o más codones conducen típicamente a una pérdida total de actividad enzimática. Las instrucciones para generar tales mutaciones pertenecen a la técnica anterior y se pueden encontrar en libros de texto conocidos de genética y biología molecular, tal como el libro de texto de Knippers ("Molekulare Genetik", 6ª edición, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Alemania, 1995), el de Winnacker ("Gene und Klone", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1990) o el de Hagemann ("Allgemeine Genetik", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986).
- Como resultado del uso de las medidas para lograr la atenuación, normalmente la actividad o concentración de la proteína correspondiente se reduce hasta una cantidad de 0 a 75%, de 0 a 50%, de 0 a 25%, de 0 a 10%, de 0 a 5% o de 0 a 1%, de la actividad o concentración de la proteína de tipo salvaje, o de la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo de partida.
- Los microorganismos preparados según la invención, que son igualmente una materia objeto de la presente invención, se pueden cultivar de forma continua o discontinua, en un proceso por lotes, o un proceso por lotes alimentados, o un proceso por lotes alimentados repetidos, con el fin de producir L-prolina. Un resumen de los métodos de cultivo conocidos se describe en el libro de texto de Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik [Tecnología de Bioprocesos 1. Introducción de Tecnología de Bioprocesos] (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)), o en el libro de texto de Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen [Biorreactores y Equipo Periférico] (Vieweg Verlag, Brunswick/Wiesbaden, 1994)).
- El medio de cultivo a usar debe satisfacer de forma adecuada los requisitos de las cepas particulares. En el manual "Manual of Methods for General Bacteriology", publicado por la American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) se dan las descripciones de medios para cultivar diversos organismos.
- La fuente de carbono empleada puede ser azúcares e hidratos de carbono, tales como, por ejemplo, glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, molasas, almidón y celulosa, aceites y grasas, tales como, por ejemplo, aceite de haba de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y aceite de coco, ácidos grasos tales como, por ejemplo, ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes tales como, por ejemplo, glicerol y etanol, alcoholes de azúcares tales como, por ejemplo, ribitol o manitol, y ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético. Estas sustancias se pueden usar individualmente o como mezclas.
- La fuente de nitrógeno empleada puede ser compuestos orgánicos que contienen nitrógeno, tales como peptonas, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, licor de maíz fermentado, harina de haba de soja y urea, o compuestos inorgánicos tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Las fuentes de nitrógeno se pueden usar individualmente o como mezclas.
- La fuente de fósforo empleada puede ser ácido fosfórico, dihidrogenofosfato de potasio o hidrogenofosfato dipotásico, o las sales correspondientes que contienen sodio. El medio de cultivo debe contener además sales de metales, por ejemplo sulfato de magnesio o sulfato de hierro, que son necesarias para el crecimiento. Finalmente, se pueden usar sustancias esenciales para el crecimiento, tales como aminoácidos y vitaminas, además de las sustancias mencionadas anteriormente. Además de esto, se pueden añadir al medio de cultivo precursores adecuados. Las sustancias añadidas mencionadas se pueden añadir al cultivo en forma de una mezcla de una sola vez, o se pueden alimentar de manera adecuada durante el cultivo.
- Los compuestos básicos, tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco o amoníaco acuoso, o compuestos ácidos tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico se emplean de manera adecuada para controlar el pH del cultivo. Es posible usar antiespumantes tales como, por ejemplo, ésteres poliglicólicos de ácidos grasos, para

controlar la formación de espuma. Se pueden añadir al medio sustancias adecuadas que actúan selectivamente, tales como, por ejemplo, antibióticos, a fin de mantener la estabilidad de los plásmidos. A fin de mantener las condiciones aerobias, se hace pasar en el cultivo oxígeno o mezclas gaseosas que contienen oxígeno, tales como, por ejemplo, aire. La temperatura del cultivo es normalmente de 20°C a 45°C, y preferiblemente de 25°C a 40°C. El cultivo se continúa hasta que se ha formado un máximo de L-prolina, o hasta que el rendimiento o productividad ha alcanzado un nivel óptimo deseado. Este objetivo se logra normalmente en 10 horas a 160 horas.

Los métodos para determinar L-prolina se describen en la técnica anterior. El análisis puede tener lugar, por ejemplo, por medio de cromatografía de intercambio aniónico, seguido de derivatización con ninhidrina y de la detección a una longitud de onda apropiada, como se describe en Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30 (1958), 1190).

En consecuencia, otra realización de la presente invención constituye un procedimiento para producir L-prolina

a) fermentando organismos hospedantes que expresan o sobreexpresan al menos una de las secuencias nucleotídicas según la invención, y

b) aislando o recogiendo L-prolina, cuando sea apropiado con componentes del caldo de fermentación y/o de la biomasa.

Se da preferencia al empleo de un procedimiento para producir L-prolina que comprende las siguientes etapas:

a) fermentar bacterias corineformes que expresan o sobreexpresan al menos una de las secuencias nucleotídicas según la invención,

b) concentrar L-prolina en el caldo de fermentación o en las células de las bacterias corineformes,

c) aislar o recoger L-prolina del caldo de fermentación, cuando sea apropiado

d) con componentes del caldo de fermentación y/o de la biomasa (de > 0 a < 100% en peso de biomasa, preferiblemente de 10 a 80% en peso, más preferiblemente 20-60% en peso).

La L-prolina producida de esta manera se puede recolectar y aislar y, cuando sea apropiado, purificar, como lo determina el experto.

El procedimiento según la invención se usa para la producción de L-prolina por fermentación.

La expresión "posición comparable" significa, según la invención, una posición que, comparando la secuencia de partida con la secuencia comparativa con aplicación de un programa de comparación de secuencias (BLAST, Altschul et al. J. Mol. Biol. 1990, 215, 403-10) en la posición contemplada de la secuencia de partida, proporciona una posición de aminoácidos en la secuencia comparativa que difiere de la posición a comparar en no más de ± 5 , más preferiblemente ± 4 , adicionalmente de forma preferible ± 3 , todavía más preferiblemente ± 2 , muy preferiblemente ± 1 , y especialmente cero posiciones.

Las instrucciones con respecto a la hibridación las puede encontrar el experto, entre otros, en el manual "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" de Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania, 1993), y en Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). La hibridación se lleva a cabo en condiciones restrictivas, es decir, sólo se forman híbridos en los que la sonda, por ejemplo la secuencia nucleotídica complementaria a SEC ID NO: 3, y la secuencia diana, es decir, los polinucleótidos tratados con la sonda, son al menos 70% idénticas. Se sabe que la restricción de la hibridación, incluyendo aquella de las etapas de lavado, está influida o determinada por la variación de la composición del tampón, la temperatura y la concentración de sal. La reacción de hibridación se lleva a cabo generalmente a una restricción relativamente baja en comparación con las etapas de lavado (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

Por ejemplo, para la reacción de hibridación se puede usar un tampón que corresponde a un tampón de SSC 5x a una temperatura de aprox. 50°C-68°C. En este caso, las sondas también se pueden hibridar con polinucleótidos que son menos de 70% idénticos a la secuencia de la sonda. Tales híbridos son menos estables y se eliminan mediante lavado en condiciones restrictivas. Esto se puede lograr, por ejemplo, reduciendo la concentración de sal hasta 2x SSC y, cuando sea apropiado, subsiguientemente hasta 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania, 1995), ajustándose la temperatura a aprox. 52°C-68°C, aprox. 54°C-68°C, aprox. 56°C-68°C, aprox. 58°C-68°C, aprox. 60°C-68°C, aprox. 62°C-68°C, aprox. 64°C-68°C, aprox. 66°C-68°C. Se da preferencia a llevar a cabo las etapas de lavado a temperaturas de aprox. 62°C-68°C, particularmente de forma preferible aprox. 64°C-68°C o aprox. 66°C-68°C. Es posible, cuando sea apropiado, reducir la concentración de sal hasta una concentración que corresponde a 0,2x SSC o 0,1x SSC. Incrementando gradualmente la temperatura de la hibridación en etapas de aprox. 1-2°C desde 50°C hasta 68°C, es posible aislar fragmentos polinucleotídicos que tienen al menos 70% o al menos 80% o al menos 90% a 95% o al menos 96% a 98% o al menos 99% de identidad con la secuencia de la sonda empleada. Las instrucciones adicionales con

respecto a la hibridación están comercialmente disponibles en forma de “kits” (por ejemplo, DIG Easy Hyb de Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, Número de Catálogo 1603558).

5 Según la invención, los polipéptidos reivindicados (secuencias de aminoácidos) también comprenden aquellas secuencias que tienen una homología (a nivel de aminoácidos) y, respectivamente, identidad (a nivel de ácidos nucleicos, excluyendo la degeneración natural) de más de 90% (también con respecto a los polipéptidos), producto más de 91%, 92%, 93% o 94%, más preferiblemente más de 95% o 96%, y particularmente de forma preferible más de 97%, 98% o 99% (con respecto a ambos tipos de secuencias) con cualquiera de estas secuencias, en tanto que se retenga la acción o el propósito de tal secuencia. El término “homología” (o identidad), como se usa aquí, se puede definir por la ecuación $H(\%) = [1 - V/X] \times 100$, en la que H es la homología, X es el número total de aminoácidos de la secuencia comparativa, y V es el número de diferentes nucleobases/aminoácidos de la secuencia a considerar, basándose en la secuencia comparativa. En cualquier caso, la expresión secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos incluye cualesquiera secuencias que parecen posibles según la degeneración del código genético.

15 El porcentaje de identidad para las secuencias de aminoácidos indicadas en la presente memoria descriptiva por los números SEC ID se puede determinar fácilmente por la persona experta usando métodos conocidos en la técnica anterior. Un programa adecuado que se puede emplear según la invención es BLASTP (Altschul et al., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402). La secuencias de ácidos nucleicos según la invención puede ser una molécula de ADN o una molécula de ARN. Se da preferencia a que la secuencia de ácidos nucleicos sea una molécula de ADN o una molécula de ARNm. Según la invención, la molécula de ADN puede ser además una molécula de ADN genómico o una molécula de ADN aislado. La invención engloba además realizaciones en las que la molécula de ADN es una molécula de PNA u otro derivado de una molécula de ADN.

Los microorganismos mencionados en esta solicitud, que se indican por un número DSMZ, se pueden obtener de la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Mascheroder Weg 4, Brunswick (Alemania).

25 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Degussa AG

<120> Mutante del gen proB de las bacterias corineformes

<130> 040071 AM

30 <160> 6

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1110

35 <212> ADN

<213> bacteria corineforme

<220>

<221> CDS

40 <222> (1)..(1107)

<220>

<221> misc_feature

45 <222> (445)..(447)

ES 2 362 105 T3

<223> Xaa todos los aminoácidos proteínogénicos distintos de glicina

<400> 1

atg cgt gag cgc atc tcc aac gct aag cga gtg gtg gtg aaa att ggt	48
Met Arg Glu Arg Ile Ser Asn Ala Lys Arg Val Val Val Lys Ile Gly	
1 5 10 15	
tcg tcc tca ttg act aac gat gag gac gga cac acc gtc gat ccc aac	96
Ser Ser Ser Leu Thr Asn Asp Glu Asp Gly His Thr Val Asp Pro Asn	
20 25 30	
cgc atc aac act att gtc aat gcc ttg caa gca cgc atg gaa gct ggc	144
Arg Ile Asn Thr Ile Val Asn Ala Leu Gln Ala Arg Met Glu Ala Gly	
35 40 45	
tcg gac ctc atc gtt gtg tcc tct ggc gca gtg gcc gcg gga atg gcc	192
Ser Asp Leu Ile Val Val Ser Ser Gly Ala Val Ala Ala Gly Met Ala	
50 55 60	
ccg .ctt gga ttg agc acc cgg ccc acg gaa ttg gca gtc aag cag gct	240
Pro Leu Gly Leu Ser Thr Arg Pro Thr Glu Leu Ala Val Lys Gln Ala	
65 70 75 80	
gca gca gca gtg ggg caa gtt cac ctc atg cac cag tgg gga cgt tct	288
Ala Ala Ala Val Gly Gln Val His Leu Met His Gln Trp Gly Arg Ser	
85 90 95	
ttt gcc cgg tat ggt cgc ccc atc ggc cag gtg ctt ctt acc gca gct	336
Phe Ala Arg Tyr Gly Arg Pro Ile Gly Gln Val Leu Leu Thr Ala Ala	
100 105 110	
gat gca gga aag cgt gat cgt gcg agg aat gcg cag cgt acc atc gac	384
Asp Ala Gly Lys Arg Asp Arg Ala Arg Asn Ala Gln Arg Thr Ile Asp	
115 120 125	

aag ctg cgc att ttg ggc gcg gtt cct atc gtc aat gaa aat gac acc	432
Lys Leu Arg Ile Leu Gly Ala Val Pro Ile Val Asn Glu Asn Asp Thr	
130 135 140	
gtg gca acc acc nnn gtg aat ttt ggt gac aac gac cga ctt gct gca	480
Val Ala Thr Thr Xaa Val Asn Phe Gly Asp Asn Asp Arg Leu Ala Ala	
145 150 155 160	
att gtg gcg cac ctg gtg tcg gct gat gct ttg gtg ctg ctc agt gac	528
Ile Val Ala His Leu Val Ser Ala Asp Ala Leu Val Leu Leu Ser Asp	
165 170 175	
gtg gat gga ctt ttt gat aaa aac cct act gat ccc acc gcg aag ttt	576
Val Asp Gly Leu Phe Asp Lys Asn Pro Thr Asp Pro Thr Ala Lys Phe	
180 185 190	
att tcc gag gtt cgt gac ggc aat gat ttg aaa ggt gtc att gcc ggc	624
Ile Ser Glu Val Arg Asp Gly Asn Asp Leu Lys Gly Val Ile Ala Gly	
195 200 205	
gac ggc gga aaa gtg ggc acc ggt ggc atg gca tca aag gtg tct gct	672
Asp Gly Gly Lys Val Gly Thr Gly Gly Met Ala Ser Lys Val Ser Ala	
210 215 220	
gca cgt ttg gct tcc cga agt ggc gtg cct gtg ctg ttg acc tct gcg	720
Ala Arg Leu Ala Ser Arg Ser Gly Val Pro Val Leu Leu Thr Ser Ala	
225 230 235 240	
gca aac att ggc cca gca ctg gaa gac gcc cag gtg ggc act gta ttc	768
Ala Asn Ile Gly Pro Ala Leu Glu Asp Ala Gln Val Gly Thr Val Phe	
245 250 255	
cac ccc aag gac aac cgc ctc tcc gcg tgg aag ttc tgg gct ttg tat	816
His Pro Lys Asp Asn Arg Leu Ser Ala Trp Lys Phe Trp Ala Leu Tyr	
260 265 270	
gcc gca gat act gca gga aag atc cga ctc gat gac ggc gcg gtg gaa	864
Ala Ala Asp Thr Ala Gly Lys Ile Arg Leu Asp Asp Gly Ala Val Glu	
275 280 285	
gca gtg acc tcc ggt ggt aaa tct ttg ctg gct gtg ggc att act gaa	912
Ala Val Thr Ser Gly Gly Lys Ser Leu Leu Ala Val Gly Ile Thr Glu	
290 295 300	
atc att ggt gat ttc cag cag ggt gag atc gtg gag atc ttg gga cct	960
Ile Ile Gly Asp Phe Gln Gln Gly Glu Ile Val Glu Ile Leu Gly Pro	
305 310 315 320	
gcc ggc caa atc atc ggg cga ggc gag gtg tcc tac gat tct gat acc	1008
Ala Gly Gln Ile Ile Gly Arg Gly Glu Val Ser Tyr Asp Ser Asp Thr	
325 330 335	
ttg caa tca atg gtt ggt atg caa acg cag gac ctt cca gat ggc atg	1056
Leu Gln Ser Met Val Gly Met Gln Thr Gln Asp Leu Pro Asp Gly Met	
340 345 350	
cag cgc ccg gta gtg cat gca gat tat ctg tcc aac tac gcc agc cgc	1104
Gln Arg Pro Val Val His Ala Asp Tyr Leu Ser Asn Tyr Ala Ser Arg	
355 360 365	

<210> 2

<211> 369

<212> PRT

<213> bacteria corineforme

<220>

5 <221> misc_feature

<222> (149)..(149)

<223> "Xaa" en la localización 149 representa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

10 <400> 2

```

Met Arg Glu Arg Ile Ser Asn Ala Lys Arg Val Val Val Lys Ile Gly
1          5          10          15

Ser Ser Ser Leu Thr Asn Asp Glu Asp Gly His Thr Val Asp Pro Asn
          20          25          30

Arg Ile Asn Thr Ile Val Asn Ala Leu Gln Ala Arg Met Glu Ala Gly
          35          40          45

Ser Asp Leu Ile Val Val Ser Ser Gly Ala Val Ala Ala Gly Met Ala
          50          55          60

Pro Leu Gly Leu Ser Thr Arg Pro Thr Glu Leu Ala Val Lys Gln Ala
65          70          75          80

Ala Ala Ala Val Gly Gln Val His Leu Met His Gln Trp Gly Arg Ser
          85          90          95

Phe Ala Arg Tyr Gly Arg Pro Ile Gly Gln Val Leu Leu Thr Ala Ala
          100          105          110

Asp Ala Gly Lys Arg Asp Arg Ala Arg Asn Ala Gln Arg Thr Ile Asp
          115          120          125

Lys Leu Arg Ile Leu Gly Ala Val Pro Ile Val Asn Glu Asn Asp Thr
          130          135          140

Val Ala Thr Thr Xaa Val Asn Phe Gly Asp Asn Asp Arg Leu Ala Ala
145          150          155          160

Ile Val Ala His Leu Val Ser Ala Asp Ala Leu Val Leu Leu Ser Asp
          165          170          175

```

Val Asp Gly Leu Phe Asp Lys Asn Pro Thr Asp Pro Thr Ala Lys Phe
 180 185 190

Ile Ser Glu Val Arg Asp Gly Asn Asp Leu Lys Gly Val Ile Ala Gly
 195 200 205

Asp Gly Gly Lys Val Gly Thr Gly Gly Met Ala Ser Lys Val Ser Ala
 210 215 220

Ala Arg Leu Ala Ser Arg Ser Gly Val Pro Val Leu Leu Thr Ser Ala
 225 230 235 240

Ala Asn Ile Gly Pro Ala Leu Glu Asp Ala Gln Val Gly Thr Val Phe
 245 250 255

His Pro Lys Asp Asn Arg Leu Ser Ala Trp Lys Phe Trp Ala Leu Tyr
 260 265 270

Ala Ala Asp Thr Ala Gly Lys Ile Arg Leu Asp Asp Gly Ala Val Glu
 275 280 285

Ala Val Thr Ser Gly Gly Lys Ser Leu Leu Ala Val Gly Ile Thr Glu
 290 295 300

Ile Ile Gly Asp Phe Gln Gln Gly Glu Ile Val Glu Ile Leu Gly Pro
 305 310 315 320

Ala Gly Gln Ile Ile Gly Arg Gly Glu Val Ser Tyr Asp Ser Asp Thr
 325 330 335

Leu Gln Ser Met Val Gly Met Gln Thr Gln Asp Leu Pro Asp Gly Met
 340 345 350

Gln Arg Pro Val Val His Ala Asp Tyr Leu Ser Asn Tyr Ala Ser Arg
 355 360 365

Ala

<210> 3

<211> 1110

<212> ADN

5 <213> bacteria corineforme

<220>

<221 > CDS

<222> (1)..(1107)

<220>

<221> mutación

5 <222> (446)..(446)

<223> adenina

<400> 3

atg cgt gag cgc atc tcc aac gct aag cga gtg gtg gtg aaa att ggt	48
Met Arg Glu Arg Ile Ser Asn Ala Lys Arg Val Val Val Lys Ile Gly	
1 5 10 15	
tcg tcc tca ttg act aac gat gag gac gga cac acc gtc gat ccc aac	96
Ser Ser Ser Leu Thr Asn Asp Glu Asp Gly His Thr Val Asp Pro Asn	
20 25 30	
cgc atc aac act att gtc aat gcc ttg caa gca cgc atg gaa gct ggc	144
Arg Ile Asn Thr Ile Val Asn Ala Leu Gln Ala Arg Met Glu Ala Gly	
35 40 45	
tcg gac ctc atc gtt gtg tcc tct ggc gca gtg gcc gcg gga atg gcc	192
Ser Asp Leu Ile Val Val Ser Ser Gly Ala Val Ala Ala Gly Met Ala	
50 55 60	
ccg ctt gga ttg agc acc cgg ccc acg gaa ttg gca gtc aag cag gct	240
Pro Leu Gly Leu Ser Thr Arg Pro Thr Glu Leu Ala Val Lys Gln Ala	
65 70 75 80	
gca gca gca gtg ggg caa gtt cac ctc atg cac cag tgg gga cgt tct	288
Ala Ala Ala Val Gly Gln Val His Leu Met His Gln Trp Gly Arg Ser	
85 90 95	
ttt gcc cgg tat ggt cgc ccc atc ggc cag gtg ctt ctt acc gca gct	336
Phe Ala Arg Tyr Gly Arg Pro Ile Gly Gln Val Leu Leu Thr Ala Ala	
100 105 110	
gat gca gga aag cgt gat cgt gcg agg aat gcg cag cgt acc atc gac	384
Asp Ala Gly Lys Arg Asp Arg Ala Arg Asn Ala Gln Arg Thr Ile Asp	
115 120 125	
aag ctg cgc att ttg ggc gcg gtt cct atc gtc aat gaa aat gac acc	432
Lys Leu Arg Ile Leu Gly Ala Val Pro Ile Val Asn Glu Asn Asp Thr	
130 135 140	
gtg gca acc acc gat gtg aat ttt ggt gac aac gac cga ctt gct gca	480
Val Ala Thr Thr Asp Val Asn Phe Gly Asp Asn Asp Arg Leu Ala Ala	
145 150 155 160	
att gtg gcg cac ctg gtg tcg gct gat gct ttg gtg ctg ctc agt gac	528
Ile Val Ala His Leu Val Ser Ala Asp Ala Leu Val Leu Leu Ser Asp	
165 170 175	
gtg gat gga ctt ttt gat aaa aac cct act gat ccc acc gcg aag ttt	576
Val Asp Gly Leu Phe Asp Lys Asn Pro Thr Asp Pro Thr Ala Lys Phe	
180 185 190	
att tcc gag gtt cgt gac ggc aat gat ttg aaa ggt gtc att gcc ggc	624
Ile Ser Glu Val Arg Asp Gly Asn Asp Leu Lys Gly Val Ile Ala Gly	
195 200 205	
gac ggc gga aaa gtg ggc acc ggt ggc atg gca tca aag gtg tct gct	672
Asp Gly Gly Lys Val Gly Thr Gly Gly Met Ala Ser Lys Val Ser Ala	
210 215 220	

ES 2 362 105 T3

gca cgt ttg gct tcc cga agt ggc gtg cct gtg ctg ttg acc tct gcg Ala Arg Leu Ala Ser Arg Ser Gly Val Pro Val Leu Leu Thr Ser Ala 225 230 235 240	720
gca aac att ggc cca gca ctg gaa gac gcc cag gtg ggc act gta ttc Ala Asn Ile Gly Pro Ala Leu Glu Asp Ala Gln Val Gly Thr Val Phe 245 250 255	768
cac ccc aag gac aac cgc ctc tcc gcg tgg aag ttc tgg gct ttg tat His Pro Lys Asp Asn Arg Leu Ser Ala Trp Lys Phe Trp Ala Leu Tyr 260 265 270	816
gcc gca gat act gca gga aag atc cga ctc gat gac ggc gcg gtg gaa Ala Ala Asp Thr Ala Gly Lys Ile Arg Leu Asp Asp Gly Ala Val Glu 275 280 285	864
gca gtg acc tcc ggt ggt aaa tct ttg ctg gct gtg ggc att act gaa Ala Val Thr Ser Gly Gly Lys Ser Leu Leu Ala Val Gly Ile Thr Glu 290 295 300	912
atc att ggt gat ttc cag cag ggt gag atc gtg gag atc ttg gga cct Ile Ile Gly Asp Phe Gln Gln Gly Glu Ile Val Glu Ile Leu Gly Pro 305 310 315 320	960
gcc ggc caa atc atc ggg cga ggc gag gtg tcc tac gat tct gat acc Ala Gly Gln Ile Ile Gly Arg Gly Glu Val Ser Tyr Asp Ser Asp Thr 325 330 335	1008
ttg caa tca atg gtt ggt atg caa acg cag gac ctt cca gat ggc atg Leu Gln Ser Met Val Gly Met Gln Thr Gln Asp Leu Pro Asp Gly Met 340 345 350	1056
cag cgc ccg gta gtg cat gca gat tat ctg tcc aac tac gcc agc cgc Gln Arg Pro Val Val His Ala Asp Tyr Leu Ser Asn Tyr Ala Ser Arg 355 360 365	1104
gcg taa Ala	1110

<210> 4

<211 > 369

5 <212> PRT

<213> bacteria corineforme

<400> 4

ES 2 362 105 T3

Ser Asp Leu Ile Val Val Ser Ser Gly Ala Val Ala Ala Gly Met Ala
50 55 60

Pro Leu Gly Leu Ser Thr Arg Pro Thr Glu Leu Ala Val Lys Gln Ala
65 70 75 80

Ala Ala Ala Val Gly Gln Val His Leu Met His Gln Trp Gly Arg Ser
85 90 95

Phe Ala Arg Tyr Gly Arg Pro Ile Gly Gln Val Leu Leu Thr Ala Ala
100 105 110

Asp Ala Gly Lys Arg Asp Arg Ala Arg Asn Ala Gln Arg Thr Ile Asp
115 120 125

Lys Leu Arg Ile Leu Gly Ala Val Pro Ile Val Asn Glu Asn Asp Thr
130 135 140

Val Ala Thr Thr Asp Val Asn Phe Gly Asp Asn Asp Arg Leu Ala Ala
145 150 155 160

Ile Val Ala His Leu Val Ser Ala Asp Ala Leu Val Leu Leu Ser Asp
165 170 175

Val Asp Gly Leu Phe Asp Lys Asn Pro Thr Asp Pro Thr Ala Lys Phe
180 185 190

Ile Ser Glu Val Arg Asp Gly Asn Asp Leu Lys Gly Val Ile Ala Gly
195 200 205

Asp Gly Gly Lys Val Gly Thr Gly Gly Met Ala Ser Lys Val Ser Ala
210 215 220

Ala Arg Leu Ala Ser Arg Ser Gly Val Pro Val Leu Leu Thr Ser Ala
225 230 235 240

Ala Asn Ile Gly Pro Ala Leu Glu Asp Ala Gln Val Gly Thr Val Phe
245 250 255

His Pro Lys Asp Asn Arg Leu Ser Ala Trp Lys Phe Trp Ala Leu Tyr
260 265 270

Ala Ala Asp Thr Ala Gly Lys Ile Arg Leu Asp Asp Gly Ala Val Glu
275 280 285

Ala Val Thr Ser Gly Gly Lys Ser Leu Leu Ala Val Gly Ile Thr Glu
290 295 300

ES 2 362 105 T3

Ile Ile Gly Asp Phe Gln Gln Gly Glu Ile Val Glu Ile Leu Gly Pro
 305 310 315 320

Ala Gly Gln Ile Ile Gly Arg Gly Glu Val Ser Tyr Asp Ser Asp Thr
 325 330 335

Leu Gln Ser Met Val Gly Met Gln Thr Gln Asp Leu Pro Asp Gly Met
 340 345 350

Gln Arg Pro Val Val His Ala Asp Tyr Leu Ser Asn Tyr Ala Ser Arg
 355 360 365

Ala

<210> 5

<211> 1110

5 <212> ADN

<213> bacteria corineforme

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(1 107)

<220>

<221> mutación

<222> (446)..(446)

15 <223> adenina

<400> 5

ES 2 362 105 T3

atg	cgt	gaa	cgc	atc	tcc	aac	gct	aag	cga	gtg	gtg	gtg	aaa	att	ggt	48
Met	Arg	Glu	Arg	Ile	Ser	Asn	Ala	Lys	Arg	Val	Val	Val	Lys	Ile	Gly	
1				5				10					15			
tcg	tcc	tca	ttg	act	aac	gat	gag	gac	gga	cac	acc	gtc	gat	ccc	aac	96
Ser	Ser	Ser	Leu	Thr	Asn	Asp	Glu	Asp	Gly	His	Thr	Val	Asp	Pro	Asn	
			20					25					30			
cgc	atc	aac	act	att	gtc	aat	gcc	ttg	caa	gca	cgc	atg	gaa	gct	ggc	144
Arg	Ile	Asn	Thr	Ile	Val	Asn	Ala	Leu	Gln	Ala	Arg	Met	Glu	Ala	Gly	
		35					40					45				
tcg	gac	ctc	atc	gtt	gtg	tcc	tct	ggc	gca	gtg	gcc	gcg	gga	atg	gcc	192
Ser	Asp	Leu	Ile	Val	Val	Ser	Ser	Gly	Ala	Val	Ala	Ala	Gly	Met	Ala	
	50					55					60					
ccg	ctt	gga	ttg	agc	acc	cgg	ccc	acg	gaa	ttg	gca	gtc	aag	cag	gct	240
Pro	Leu	Gly	Leu	Ser	Thr	Arg	Pro	Thr	Glu	Leu	Ala	Val	Lys	Gln	Ala	
65					70					75				80		
gca	gca	gca	gtg	ggg	caa	gtt	cac	ctc	atg	cac	cag	tgg	gga	cgt	tct	288
Ala	Ala	Ala	Val	Gly	Gln	Val	His	Leu	Met	His	Gln	Trp	Gly	Arg	Ser	
				85					90					95		

ttt gcc cgg tat ggt cgc ccc atc ggc cag gtg ctt ctt acc gca gct	336
Phe Ala Arg Tyr Gly Arg Pro Ile Gly Gln Val Leu Leu Thr Ala Ala	
100 105 110	
gat gca gga aag cgt gat cgt gcg agg aat gcg cag cgt acc atc gac	384
Asp Ala Gly Lys Arg Asp Arg Ala Arg Asn Ala Gln Arg Thr Ile Asp	
115 120 125	
aag ctg cgc att ttg ggc gcg gtt cct atc gtc aat gaa aat gac acc	432
Lys Leu Arg Ile Leu Gly Ala Val Pro Ile Val Asn Glu Asn Asp Thr	
130 135 140	
gtg gca acc acc gat gtg aat ttt ggt gac aac gac cga ctt gct gca	480
Val Ala Thr Thr Asp Val Asn Phe Gly Asp Asn Asp Arg Leu Ala Ala	
145 150 155 160	
att gtg gcg cac ctg gtg tcg gct gac gct ttg gtg ctg ctc agt gac	528
Ile Val Ala His Leu Val Ser Ala Asp Ala Leu Val Leu Leu Ser Asp	
165 170 175	
gtg gat gga ctt ttt gat aag aac cct act gat ccc acc gcg aag ttt	576
Val Asp Gly Leu Phe Asp Lys Asn Pro Thr Asp Pro Thr Ala Lys Phe	
180 185 190	
att tcc gag gtt cgt gac ggc aat gat ttg aaa ggt gtc att gcc ggc	624
Ile Ser Glu Val Arg Asp Gly Asn Asp Leu Lys Gly Val Ile Ala Gly	
195 200 205	
gac ggc gga aaa gtg ggc acc ggc ggc atg gca tca aag gtg tct gct	672
Asp Gly Gly Lys Val Gly Thr Gly Gly Met Ala Ser Lys Val Ser Ala	
210 215 220	
gca cgt ttg gct tcc cga agt ggc gtg cct gtg ctg ttg acc tct gcg	720
Ala Arg Leu Ala Ser Arg Ser Gly Val Pro Val Leu Leu Thr Ser Ala	
225 230 235 240	
gca aac att ggc cca gca ctg gaa gac gcc cag gtg ggc act gta ttc	768
Ala Asn Ile Gly Pro Ala Leu Glu Asp Ala Gln Val Gly Thr Val Phe	
245 250 255	
cac ccc aag gac aac cgc ctc tcc gcg tgg aag ttc tgg gct ttg tat	816
His Pro Lys Asp Asn Arg Leu Ser Ala Trp Lys Phe Trp Ala Leu Tyr	
260 265 270	
gcc gca gat act gca gga aag atc cga ctt gat gat ggc gcg gtg gaa	864
Ala Ala Asp Thr Ala Gly Lys Ile Arg Leu Asp Asp Gly Ala Val Glu	
275 280 285	
gca gtg acc tcc ggt ggt aaa tct ttg ctg gct gtg ggc att act gag	912
Ala Val Thr Ser Gly Gly Lys Ser Leu Leu Ala Val Gly Ile Thr Glu	
290 295 300	
atc att ggt gat ttc caa cag ggt gag atc gtg gag atc ttg gga cct	960
Ile Ile Gly Asp Phe Gln Gln Gly Glu Ile Val Glu Ile Leu Gly Pro	
305 310 315 320	
gcc ggc caa atc atc ggg cga ggc gag gtg tcc tac gat tct gat acc	1008
Ala Gly Gln Ile Ile Gly Arg Gly Glu Val Ser Tyr Asp Ser Asp Thr	
325 330 335	

ES 2 362 105 T3

ttg	caa	tca	atg	gtt	ggc	atg	caa	acg	cag	gac	ctt	cca	gat	ggc	atg	1056
Leu	Gln	Ser	Met	Val	Gly	Met	Gln	Thr	Gln	Asp	Leu	Pro	Asp	Gly	Met	
			340					345					350			
cag	cgc	ccg	gta	gtg	cat	gca	gat	tat	ctg	tcc	aac	tac	gcc	agc	cgc	1104
Gln	Arg	Pro	Val	Val	His	Ala	Asp	Tyr	Leu	Ser	Asn	Tyr	Ala	Ser	Arg	
		355					360					365				
gcg	taa															1110
Ala																

<210> 6

<211> 369

5 <212> PRT

<213> bacteria corineforme

<400> 6

ES 2 362 105 T3

Met Arg Glu Arg Ile Ser Asn Ala Lys Arg Val Val Val Lys Ile Gly
 1 5 10 15

Ser Ser Ser Leu Thr Asn Asp Glu Asp Gly His Thr Val Asp Pro Asn
 20 25 30

Arg Ile Asn Thr Ile Val Asn Ala Leu Gln Ala Arg Met Glu Ala Gly
 35 40 45

Ser Asp Leu Ile Val Val Ser Ser Gly Ala Val Ala Ala Gly Met Ala
 50 55 60

Pro Leu Gly Leu Ser Thr Arg Pro Thr Glu Leu Ala Val Lys Gln Ala
 65 70 75 80

Ala Ala Ala Val Gly Gln Val His Leu Met His Gln Trp Gly Arg Ser
 85 90 95

Phe Ala Arg Tyr Gly Arg Pro Ile Gly Gln Val Leu Leu Thr Ala Ala
 100 105 110

Asp Ala Gly Lys Arg Asp Arg Ala Arg Asn Ala Gln Arg Thr Ile Asp
 115 120 125

Lys Leu Arg Ile Leu Gly Ala Val Pro Ile Val Asn Glu Asn Asp Thr
 130 135 140

Val Ala Thr Thr Asp Val Asn Phe Gly Asp Asn Asp Arg Leu Ala Ala
 145 150 155 160

Ile Val Ala His Leu Val Ser Ala Asp Ala Leu Val Leu Leu Ser Asp
 165 170 175

ES 2 362 105 T3

Val Asp Gly Leu Phe Asp Lys Asn Pro Thr Asp Pro Thr Ala Lys Phe
 180 185 190

Ile Ser Glu Val Arg Asp Gly Asn Asp Leu Lys Gly Val Ile Ala Gly
 195 200 205

Asp Gly Gly Lys Val Gly Thr Gly Gly Met Ala Ser Lys Val Ser Ala
 210 215 220

Ala Arg Leu Ala Ser Arg Ser Gly Val Pro Val Leu Leu Thr Ser Ala
 225 230 235 240

Ala Asn Ile Gly Pro Ala Leu Glu Asp Ala Gln Val Gly Thr Val Phe
 245 250 255

His Pro Lys Asp Asn Arg Leu Ser Ala Trp Lys Phe Trp Ala Leu Tyr
 260 265 270

Ala Ala Asp Thr Ala Gly Lys Ile Arg Leu Asp Asp Gly Ala Val Glu
 275 280 285

Ala Val Thr Ser Gly Gly Lys Ser Leu Leu Ala Val Gly Ile Thr Glu
 290 295 300

Ile Ile Gly Asp Phe Gln Gln Gly Glu Ile Val Glu Ile Leu Gly Pro
 305 310 315 320

Ala Gly Gln Ile Ile Gly Arg Gly Glu Val Ser Tyr Asp Ser Asp Thr
 325 330 335

Leu Gln Ser Met Val Gly Met Gln Thr Gln Asp Leu Pro Asp Gly Met
 340 345 350

Gln Arg Pro Val Val His Ala Asp Tyr Leu Ser Asn Tyr Ala Ser Arg
 355 360 365

Ala

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polinucleótidos que codifican polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos que son al menos 90% idénticas a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 2, con lo que en las secuencias de aminoácidos la glicina en la posición 149 se sustituye por un aminoácido proteínogénico, con lo que el polipéptido tiene actividad de γ -glutamil cinasa.
2. Los polinucleótidos según la reivindicación 1, en los que el intercambio de aminoácidos se selecciona de SEC ID NO: 2, en los que la glicina en la posición 149 se sustituye por un aminoácido proteínogénico.
3. Los polinucleótidos según las reivindicaciones 1 ó 2, en los que la glicina en la posición 149 de SEC ID NO: 2 se sustituye por ácido L-aspártico.
- 10 4. Los polinucleótidos de la reivindicación 3, en los que dichos polinucleótidos comprenden la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3.
5. Polinucleótidos que codifican polipéptidos que tienen desde las posiciones 145 a 154 la secuencia de aminoácidos de las posiciones 145 a 154 de SEC ID NO: 2, en los que dicho polinucleótido se hibrida en condiciones restrictivas que comprenden una etapa de lavado a 0,5 SSC a 52-68°C al complemento de SEC ID NO: 3, en los que el polipéptido tiene actividad de γ -glutamil cinasa.
- 15 6. Los polinucleótidos de la reivindicación 5, en los que dichos polipéptidos codificados tienen desde las posiciones 145 a 154 la secuencia de aminoácidos de las posiciones 145 a 154 de SEC ID NO: 4.
7. Los polinucleótidos de la reivindicación 5, en los que dichos polipéptidos codificados tienen desde las posiciones 110 a 189 la secuencia de aminoácidos de las posiciones 110 a 189 de SEC ID NO: 2.
- 20 8. Los polinucleótidos de la reivindicación 6, en los que dichos polipéptidos codificados tienen desde las posiciones 110 a 189 la secuencia de aminoácidos de las posiciones 110 a 189 de SEC ID NO: 4.
9. Un vector que comprende un polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos que son al menos 90% idénticas a la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 2, con lo que el polipéptido tiene actividad de γ -glutamil cinasa, y en la posición 149 de la secuencia de aminoácidos la glicina se sustituye por un aminoácido proteínogénico.
- 25 11. Los polipéptidos según la reivindicación 10, que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEC ID NO: 2 ó 4.
12. Un hospedante transformado con el polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o el vector de la reivindicación 9.
- 30 13. El hospedante según la reivindicación 12, en el que dicho polinucleótido está contenido en el cromosoma.
14. El hospedante según la reivindicación 12, en el que los polinucleótidos según las reivindicaciones 1 a 8 están sobreexpresados.
15. El hospedante según la reivindicación 14, en el que la sobreexpresión se logra incrementando el número de copias de dichos polinucleótidos.
- 35 16. El hospedante según las reivindicaciones 12 a 15, con lo que el hospedante se escoge del grupo que comprende levaduras, E. coli, B. subtilis, bacterias corineformes.
17. El hospedante según la reivindicación 16, en el que dicho hospedante es una bacteria corineforme.
18. El hospedante según la reivindicación 14, en el que dicho hospedante es Corynebacterium glutamicum.
19. Un procedimiento para la preparación de L-prolina, que comprende
 - 40 a) fermentar el procarionta/hospedante según una o más de las reivindicaciones 12 a 18
 - b) enriquecer dicho L-aminoácido en el medio o en las células de las bacterias, y
 - c) aislar o recoger dicho aminoácido, opcionalmente con componentes procedentes de la fermentación y/o biomasa.
- 45 20. El procedimiento según la reivindicación 19, en el que se fermentan los hospedantes que comprenden uno o más genes sobreexpresados escogidos del grupo que comprende:
 - a) el gen gdh que codifica glutamato deshidrogenasa

- b) el gen proA que codifica γ -glutamyl-fosfato reductasa
- c) el gen proC que codifica la pirrolin-5-carboxilato reductasa y
- d) el gen ocd que codifica ornitina ciclodesaminasa.

5 21. El procedimiento según la reivindicación 19, en el que se fermenta el procariota/hospedante que comprende uno o más genes atenuados escogidos del grupo que comprende:

- a) el gen ilvA que codifica treonina desaminasa
- b) el gen putA que codifica prolina deshidrogenasa/pirrolin-5-carboxilato deshidrogenasa
- c) el gen sucA que codifica 2-cetoglutarato deshidrogenasa
- d) el gen sucB que codifica dihidrolipoamida succiniltransferasa, y

10 e) el gen argD que codifica acetilornitina aminotransferasa.

22. El procedimiento según las reivindicaciones 19 a 21, en el que se fermentan las bacterias corineformes.

23. El procedimiento según las reivindicaciones 19 a 21, en el que se fermenta E. coli.