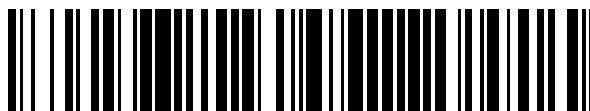


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 837**

51 Int. Cl.:
C07K 14/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06777211 .1**
96 Fecha de presentación: **03.05.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1902067**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.03.2008**

54 Título: **ALELOS DEL GEN OPCA DE BACTERIAS CORINEFORMES.**

30 Prioridad:
24.05.2005 DE 102005023829

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.02.2012

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

72 Inventor/es:
**SCHISCHKA, Natalie;
BATHE, Brigitte y
THIERBACH, Georg**

74 Agente: **Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 374 837 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

Alelos del gen *opcA* de bacterias corineformes

- 5 Son objeto del invento mutantes y alelos del gen *opcA*, que codifican variantes de la subunidad *OpcA* de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (EC: 1.1.1.49) y unos procedimientos para la producción de aminoácidos, en particular de L-lisina y L-triptófano mediando utilización de bacterias, que contienen estos alelos.

10 **Estado de la técnica**

Los aminoácidos encuentran utilización en la medicina humana, en la industria farmacéutica, en la industria alimentaria y en particular en la nutrición de animales.

- 15 Es conocido el hecho de que ciertos aminoácidos pueden ser producidos por fermentación de cepas de bacterias corineformes, en particular de *Corynebacterium glutamicum*. A causa de la gran importancia de esto, se está trabajando constantemente en el mejoramiento de los procedimientos de producción. Unos mejoramientos de los procedimientos pueden concernir a unas medidas técnicas de fermentación tales como por ejemplo la agitación y el abastecimiento con oxígeno, o a la composición de los medios nutritivos, tal como por ejemplo la concentración de azúcares durante la fermentación, o al tratamiento para dar la forma del producto mediante por ejemplo una cromatografía con intercambio de iones, o a las propiedades intrínsecas de rendimiento del microorganismo propiamente dicho.

- 20 Para el mejoramiento de las propiedades de rendimiento de estos microorganismos se utilizan unos métodos de mutagénesis, selección y elección de mutantes. De esta manera se obtienen unas cepas, que son resistentes frente a los antimetabolitos o que son auxótrofas para los metabolitos importantes en regulación y que producen aminoácidos. Un antimetabolito conocido es el compuesto análogo a lisina S-(2-aminoetil)-L-cisteína (AEC).

- 25 Desde hace algunos años se emplean asimismo unos métodos de la técnica de ADN recombinante para el mejoramiento de las cepas de *Corynebacterium* que producen L-aminoácidos, que consisten en que se amplifican unos genes individuales para la biosíntesis de los aminoácidos, y se investiga la repercusión sobre la producción de aminoácidos. Una representación recopilativa acerca de los aspectos más diversos de la genética, del metabolismo y de la biotecnología de *Corynebacterium glutamicum* se encuentra en la cita de Pühler (coordinador principal de edición) en: *Journal of Biotechnology* 104: (1-3), 1-338, 2003.

- 30 Desde hace algunos años se emplean asimismo unos métodos de la técnica de ADN recombinante para el mejoramiento de las cepas de *Corynebacterium* que producen L-aminoácidos, que consisten en que se amplifican unos genes individuales para la biosíntesis de los aminoácidos, y se investiga la repercusión sobre la producción de aminoácidos. Una representación recopilativa acerca de los aspectos más diversos de la genética, del metabolismo y de la biotecnología de *Corynebacterium glutamicum* se encuentra en la cita de Pühler (coordinador principal de edición) en: *Journal of Biotechnology* 104: (1-3), 1-338, 2003.

- 35 Moritz y colaboradores (*European Journal of Biochemistry* 267, 3442-3452 (2000)) informan acerca de investigaciones fisiológicas y bioquímicas en la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Corynebacterium glutamicum*. De acuerdo con las investigaciones de Moritz y colaboradores, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se compone de una subunidad *Zwf* y de una subunidad *OpcA*.

- 40 Un método para la determinación de la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se ha descrito en la cita de Moritz y colaboradores (*European Journal of Biochemistry* 267, 3442-3452 (2000)).
- 45 La secuencia de nucleótidos del gen que codifica la subunidad *OpcA* de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Corynebacterium glutamicum*, está generalmente disponible, entre otros lugares, en el banco de datos del National Center for Biotechnology Information (Centro nacional para información de biotecnología) (NCBI, Bethesda, MD, EE.UU.) de la National Library of Medicine (Bethesda, MD, EE.UU.) bajo el número AX121828. Ella se puede tomar además de la solicitud de patente europea EP1108790 como la secuencia n° 1744.

- 50 Se pueden aprovechar asimismo otros bancos de datos, tales como, por ejemplo, el banco de datos de secuencias de nucleótidos de los European Molecular Biology Laboratories (Laboratorios europeos de biología molecular) (EMBL, Heidelberg, Alemania o respectivamente Cambridge, Reino Unido) o el del Swiss Institute of Bioinformatics (Instituto suizo de bioinformática) (Swissprot, Ginebra, Suiza) o de la Protein Information Resource Database (Base de datos de recursos de información sobre proteínas) (PIR, Washington DC, EE.UU.).

- 55 La biosíntesis microbiana de L-aminoácidos en bacterias corineformes es un sistema complejo y está entrelazada en múltiples aspectos con otras diversas rutas metabólicas en la célula. Por ello, no se puede realizar ninguna predicción sobre si el polipéptido *OpcA* de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se modifica por mutación de tal manera que se mejore la producción de L-aminoácidos. Para el mejor carácter sinóptico, la secuencia de nucleótidos del gen *zwf* (gen de tipo silvestre) que codifica la subunidad *OpcA* de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Corynebacterium glutamicum*, se representa de acuerdo con los datos del banco de datos del NCBI en la SEQ ID NO: 1, y la secuencia de aminoácidos de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa codificada, que se establece a partir de ésta, se representa en las SEQ ID NO: 2 y 4. En la SEQ ID NO: 3 se indican adicionalmente unas secuencias de nucleótidos, que están situadas corriente arriba (en inglés "upstream") y corriente abajo (en inglés "downstream").

65 **Misión del invento**

Los autores del invento se han planteado la misión de poner a disposición unas cepas mejoradas de

microorganismos, que produzcan unas cantidades aumentadas de aminoácidos, en particular de L-lisina y L-triptófano.

Descripción del invento

5 Son objeto del invento unos mutantes de bacterias corineformes, producidos in vitro y/o in vivo, o respectivamente aislados, que segregan de manera preferida ciertos aminoácidos, y que contienen un gen o respectivamente un alelo, que codifica la subunidad OpcA de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, siendo escogida la secuencia de aminoácidos del polipéptido entre el conjunto que se compone de

10 a) la SEQ ID NO: 6, en la que en la posición 107 de la secuencia de aminoácidos se encuentra L-histidina, en la posición 219 se encuentra L-asparagina, en la posición 233 se encuentra L-serina y en la posición 261 se encuentra L-histidina,

15 b) la SEQ ID NO: 6, encontrándose, además de las mencionadas mutaciones, como máximo 5 intercambios conservativos de aminoácidos, y

20 c) la SEQ ID NO: 6, encontrándose, además de las mencionadas mutaciones, como máximo 5 inserciones o supresiones.

25 El polipéptido, que está contenido en los mutantes conformes al invento, puede ser designado asimismo como polipéptido OpcA, polipéptido OpcA de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, como subunidad OpcA de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, o como subunidad de polipéptido OpcA. En el documento EP 1 108 790 (véase la SEQ ID NO: 1744 en la Tabla 1) el polipéptido OpcA es designado también como proteína de ensamblaje de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (en inglés "glucose 6-phosphate dehydrogenase assembly protein").

30 En el caso de las bacterias corineformes se prefiere el género *Corynebacterium*. Se prefieren especialmente unas cepas que segregan aminoácidos, que se basan en las siguientes especies:

- 35 *Corynebacterium efficiens*, tal como por ejemplo la cepa DSM44549,
- Corynebacterium glutamicum*, tal como, por ejemplo, la cepa ATCC13032,
- Corynebacterium thermoaminogenes*, tal como, por ejemplo, la cepa FERM BP-1539, y
- Corynebacterium ammoniagenes*, tal como, por ejemplo, la cepa ATCC6871,

40 prefiriéndose muy especialmente la especie *Corynebacterium glutamicum*.

Algunos representantes de la especie *Corynebacterium glutamicum* son conocidos a partir del estado de la técnica también bajo otras denominaciones de especies. A estas pertenecen, por ejemplo:

- 45 *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870,
- Corynebacterium lilium* DSM20137,
- Corynebacterium melassecola* ATCC17965,
- Brevibacterium flavum* ATCC14067,
- Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869, y
- 50 *Brevibacteritium divaricatum* ATCC14020.

Unos representantes conocidos de cepas de bacterias corineformes, que segregan aminoácidos, son, por ejemplo, las cepas que producen L-lisina

- 55 *Corynebacterium glutamicum* DM58-1/pDM6 (= DSM4697) descrita en el documento de patente europea EP 0 358 940,
- Corynebacterium glutamicum* MH20-22B (= DSM16835) descrita en la cita de Menkel y colaboradores (*Applied and Environmental Microbiology* 55(3), 684-688 (1989)),
- 60 *Corynebacterium glutamicum* AHP-3 (= FERM BP-7382)) descrita en el documento EP 1 108 790,
- Corynebacterium glutamicum* NRRL B-11474, descrita en el documento de patente de los EE.UU. US 4.275.157,
- 65 *Corynebacterium thermoaminogenes* AJ12521 (= FERM BP-3304) descrita en el documento US 5.250.423,

o las cepas que producen L-triptófano

Corynebacterium glutamicum K76 (= FermBP-1847) descrita en el documento US 5.563.052,
 Corynebacterium glutamicum BPS13 (= FermBP-1777) descrita en el documento US 5.605.818, y
 Corynebacterium glutamicum FermBP-3055, descrita en el documento US 5.235.940.

Se encuentran datos sobre la clasificación taxonómica de las cepas de este conjunto de bacterias, entre otros lugares, en las citas de Seiler (*Journal of General Microbiology*, 129, 1433-1477 (1983)), de Kämpfer y Kroppenstedt (*Canadian Journal of Microbiology* 42, 989-1005 (1996)), Liebl y colaboradores (*International Journal of Systematic Bacteriology*, 41, 255-260 (1991)) y en el documento US-A-5.250.434.

Las cepas con la denominación "ATCC" se pueden adquirir de la American Type Culture Collection (Colección americana de cultivos tipos) (Manassas, VA, EE.UU.). Las cepas con la denominación "DSM" se pueden adquirir de la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares) (DSMZ, Braunschweig, Alemania). Las cepas con la denominación "FERM" se pueden adquirir del National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Instituto nacional de ciencia y tecnología industrial avanzada (AIST Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba Ibaraki, Japón). Las cepas mencionadas de *Corynebacterium thermoaminogenes* (FERM BP-1539, FERM BP-1540, FERM BP-1541 y FERM BP-1542) se describen en el documento US-A 5.250.434. Las cepas con la denominación "NRRL" se pueden adquirir de la Agricultural Research Service Patent Culture Collection (Colección de cultivos de patentes del servicio para la investigación agrícola) (ARS, Peoria, Illinois, EE.UU.).

Por el concepto de aminoácidos proteínógenos se entienden los aminoácidos, que se presentan en proteínas naturales, es decir en proteínas de microorganismos, plantas, animales y seres humanos. A éstos pertenecen en particular los L-aminoácidos, que se escogen entre el conjunto que se compone de ácido L-aspártico, L-asparagina, L-treonina, L-serina, ácido L-glutámico, L-glutamina, glicina, L-alanina, L-cisteína, L-valina, L-metionina, L-iso-leucina, L-leucina, L-tirosina, L-fenilalanina, L-histidina, L-lisina, L-triptófano, L-prolina y L-arginina. A los L-aminoácidos pertenece asimismo la L-homoserina.

Los mutantes conformes al invento segregan de manera preferida los mencionados aminoácidos proteínógenos, en particular L-lisina y L-triptófano. El concepto de aminoácidos abarca también sus sales, tales como por ejemplo el monohidrócloruro de lisina o el sulfato de lisina en el caso del aminoácido L-lisina.

Son objeto del invento además unos mutantes de bacterias corineformes, que contienen un alelo *opcA*, que codifica un polipéptido *OpcA*, que está caracterizado porque la secuencia de aminoácidos del polipéptido se compone de la SEQ ID NO: 6, en la que

- a) en la posición 107 de la secuencia de aminoácidos se encuentra L-histidina,
- b) en la posición 219 de la secuencia de aminoácidos se encuentra L-asparagina,
- c) en la posición 233 de la secuencia de aminoácidos se encuentra L-serina, y
- d) en la posición 261 de la secuencia de aminoácidos se encuentra L-histidina,

abarcando el alelo una secuencia de nucleótidos, que es idéntica a la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido, que es obtenible mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante utilización de un par de cebadores, cuyas secuencias de nucleótidos abarcan en cada caso por lo menos 15 nucleótidos consecutivos, que se escogen entre las posiciones 1 y 334 de la SEQ ID NO: 3 y entre la secuencia de nucleótidos complementaria situada entre las posiciones 1.600 y 1.292 de la SEQ ID NO: 3. Un ejemplo de un tal par de cebadores es el par de cebadores *opcA-A1* y *opcA-E1* representado en la SEQ ID NO: 11 y la SEQ ID NO: 12. Como material de partida (ADN de molde, en inglés "template-DNA") se prefiere un ADN cromosomal de bacterias corineformes, que ha sido tratado en particular con un mutágeno. Se prefiere especialmente el ADN cromosomal del género *Corynebacterium* y se prefiere muy especialmente el de la especie *Corynebacterium glutamicum*.

Además, se describen unos mutantes de bacterias corineformes, que contienen un alelo *opcA*, que codifica un polipéptido *OpcA*, que abarca una secuencia de aminoácidos con una longitud correspondiente a 319 L-aminoácidos, teniendo la secuencia de aminoácidos del polipéptido uno o varios de los aminoácidos, que se escogen entre el conjunto que se compone de:

- a) L-histidina en la posición 107 de la secuencia de aminoácidos,
- b) L-asparagina en la posición 219 de la secuencia de aminoácidos,
- c) L-serina en la posición 233 de la secuencia de aminoácidos, y
- d) L-histidina en la posición 261 de la secuencia de aminoácidos.

Además, son objeto del invento unos mutantes de bacterias corineformes, que contienen un alelo *opcA*, que contiene un polipéptido *OpcA*, que en las posiciones 107 hasta 261 de la secuencia de aminoácidos contiene la secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 107 hasta 261 de la SEQ ID NO: 6. De manera preferida, la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado contiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 98 hasta 270 de la SEQ ID NO: 6 o a las posiciones 83 hasta 285 de la SEQ ID NO: 6 o a las posiciones 63 hasta 305 de la SEQ ID NO: 6 o a las posiciones 38 hasta 315 de la SEQ ID NO: 6 o a las posiciones 8 hasta 315 de la SEQ ID NO: 6 o a las posiciones 2 hasta 315 de la SEQ ID NO: 6 o a las posiciones 2 hasta 317 de la SEQ ID NO: 6 o a las posiciones 2 hasta 319 de la SEQ ID NO: 6. De manera muy especialmente preferida, la longitud del polipéptido codificado abarca 319 aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

Además, se describen unos mutantes de bacterias corineformes, que contienen un alelo *opcA*, que codifica un polipéptido *OpcA*, teniendo la secuencia de aminoácidos del polipéptido uno o varios de los aminoácidos, que se escogen entre el conjunto que se compone de:

- a) L-histidina en la posición 107 de la secuencia de aminoácidos,
- b) L-asparagina en la posición 219 de la secuencia de aminoácidos,
- c) L-serina en la posición 233 de la secuencia de aminoácidos, y
- d) L-histidina en la posición 261 de la secuencia de aminoácidos,

y cuya secuencia de aminoácidos es idéntica además por lo menos en un 90 %, de manera preferida por lo menos en un 92 % o por lo menos en un 94 % o por lo menos en un 96 %, y de manera muy especialmente preferida por lo menos en un 97 % o por lo menos en un 98 % o por lo menos en un 99 % o 100 % a las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 6 o 2.

Son objeto del invento además unos mutantes de bacterias corineformes, que contienen un alelo *opcA*, que codifica un polipéptido *OpcA*, estando constituida la secuencia de aminoácidos del polipéptido por la SEQ ID NO: 6, en la que

- a) en la posición 107 de la secuencia de aminoácidos se encuentra L-histidina,
- b) en la posición 219 de la secuencia de aminoácidos se encuentra L-asparagina,
- c) en la posición 233 de la secuencia de aminoácidos se encuentra L-serina, y
- d) en la posición 261 de la secuencia de aminoácidos se encuentra L-histidina,

y cuya secuencia de nucleótidos es idéntica además por lo menos en un 90 %, de manera preferida por lo menos en un 92 % o por lo menos en un 94 % o por lo menos en un 96 %, y de manera muy especialmente preferida por lo menos en un 97 % o por lo menos en un 98 % o por lo menos en un 99 % o 100 % a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5.

Un ejemplo de una secuencia de nucleótidos de un alelo *opcA*, que posee por lo menos una identidad de 99 % con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5, se muestra en la SEQ ID NO: 7. La secuencia de nucleótidos de este alelo *opcA* posee, adicionalmente a los intercambios de nucleótidos de timina por citosina en la posición 319, de adenina por citosina en la posición 657, de citosina por timina en la posición 697 y de timina por citosina en la posición 781 (véase la SEQ ID NO: 5), los intercambios de nucleótidos de citosina por timina en la posición 402, de timina por citosina en la posición 600 y de guanina por citosina en la posición 648 (véase la SEQ ID NO: 7). La formulación "guanina por citosina en la posición 648" - y formulaciones comparables - significan que la nucleobase guanina, que está presente en la posición 648 de la secuencia de tipo silvestre de la región codificadora (véase la SEQ ID NO: 1), ha sido reemplazada por citosina (véase la SEQ ID NO: 7).

En el caso de los aminoácidos aromáticos se habla de intercambios conservativos cuando la fenilalanina, el triptófano y la tirosina se intercambian entre sí. En el caso de los aminoácidos hidrófobos se habla de intercambios conservativos cuando la leucina, la isoleucina y la valina se intercambian entre sí. En el caso de los aminoácidos polares se habla de intercambios conservativos cuando la glutamina y la asparagina se intercambian entre sí. En el caso de los aminoácidos de carácter básico se habla de intercambios conservativos cuando la arginina, la lisina e la histidina se intercambian entre sí. En el caso de los aminoácidos de carácter ácido se habla de intercambios conservativos cuando el ácido aspártico y el ácido glutámico se intercambian entre sí. En el caso de los aminoácidos que contienen grupos hidroxilo, se habla de intercambios conservativos cuando la serina y la treonina se intercambian entre sí.

Finalmente, son objeto del invento unos mutantes de bacterias corineformes, que contienen un alelo *opcA*, que codifica un polipéptido *OpcA*, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

Es conocido que la metionina que está situada en un extremo, es eliminada en el caso de la síntesis de proteínas por unas enzimas propias del anfitrión, las denominadas aminopeptidasas,.

5 Por medio de tales inserciones y supresiones o intercambios conservativos de aminoácidos no es afectada esencialmente la actividad enzimática de las glucosa-6-fosfato deshidrogenasas que contienen la correspondiente subunidad OpcA. El concepto de "no es afectada esencialmente" significa, que la actividad enzimática de las mencionadas variantes se diferencia en como máximo un 10 %, como máximo un 7,5 %, como máximo un 5 %, como máximo un 2,5 % o como máximo un 1 % de la actividad de una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que
10 contiene una subunidad del polipéptido OpcA con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, conteniendo ésta los intercambios de aminoácidos

- a) de L-histidina en lugar de L-tirosina en la posición 107,
- 15 b) de L-asparagina en lugar de L-lisina en la posición 219,
- c) de L-serina en lugar de L-prolina en la posición 233, y
- 20 d) de L-histidina en lugar de L-tirosina en la posición 261.

Para la producción de los mutantes conformes al invento se pueden utilizar procedimientos clásicos de mutagénesis in vivo con unas poblaciones celulares de bacterias corineformes mediando utilización de sustancias mutágenas tales como, por ejemplo, la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), el metanosulfato de etilo (EMS), el 5-bromouracilo, o de luz ultravioleta. Unos métodos de mutagénesis se describen, por ejemplo, en la obra "Manual of
25 Methods for General Bacteriology" (Manual de métodos de bacteriología general) (de Gerhard y colaboradores (coordinadores de edición), American Society for Microbiology, Washington, DC, EE.UU., 1981) o en la cita de Tosaka y colaboradores (Agricultural and Biological Chemistry 42(4), 745-752 (1978), o en la cita de Konicek y colaboradores (Folia Microbiologica 33, 337-343 (1988)). Unas mutagénesis típicas mediando utilización de MNNG comprenden unas concentraciones de 50 a 500 mg/l o también unas concentraciones más altas de hasta como
30 máximo 1 g/l, y un período de tiempo de incubación de 1 a 30 minutos a un pH de 5,5 a 7,5. En estas condiciones, el número de las células capaces de vivir es reducido en una proporción de aproximadamente 50 % a 90 % o de aproximadamente 50 % a 99 % o de aproximadamente 50 % a 99,9 % o más.

A partir de la población mutagenizada de células se sacan y multiplican mutantes o respectivamente células. De manera preferida, en otra etapa adicional se investiga su capacidad de segregar aminoácidos, de manera preferida L-lisina o L-triptófano, en un cultivo de tandas (en inglés "batch") mediando utilización de un medio nutritivo adecuado. Unos adecuados medios nutritivos y unas adecuadas condiciones de ensayo se describen, entre otros, en los documentos US 6.221.636, US 5.840.551, US 5.770.409, US 5.605.818, US 5.275.940 y US 4.224.409. En los casos de utilizaciones de unas instalaciones robóticas apropiadas, tales como las que se describen por ejemplo
40 en la cita de Zimmermann y colaboradores (VDI Berichte n° 1.841, editorial VDI-Verlag, Düsseldorf, Alemania 2004, 439-443) o de Zimmermann (Chemie Ingenieur Technik 77 (4), 426-428 (2005)), se pueden investigar numerosos mutantes en un breve período de tiempo. De esta manera son identificados los mutantes que, en comparación con la cepa parental o respectivamente con la cepa de partida no mutagenizada, segregan aminoácidos de manera multiplicada al medio nutritivo o al interior de las células. A éstos pertenecen, por ejemplo, los mutantes cuya
45 secreción de aminoácidos se ha aumentado por lo menos en un 0,5 %.

A continuación, a partir de los mutantes se pone a disposición o respectivamente se aísla un ADN, y con ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa, mediando utilización de unos pares de cebadores, que permiten la amplificación del gen opcA o respectivamente de los alelos opcA conformes al invento o de las mutaciones conformes al invento en las posiciones 107, 219, 233 y 261 de la secuencia de aminoácidos del polipéptido OpcA, se sintetiza el correspondiente polinucleótido. De manera preferida, el ADN se aísla a partir de aquellos mutantes, que, en comparación con la cepa de partida, segregan aminoácidos en una medida aumentada o los enriquecen en el interior de las células.

55 A este fin, se pueden se pueden escoger unos pares de cebadores arbitrarios a partir de la secuencia de nucleótidos, que se encuentra corriente arriba y corriente abajo de la mutación conforme al invento, y de la secuencia de nucleótidos complementaria con aquella. Un cebador de un par de cebadores comprende en este caso de manera preferida por lo menos 15, por lo menos 18, por lo menos 20, por lo menos 21 o por lo menos 24 nucleótidos consecutivos, que se escogen entre la secuencia de nucleótidos que se encuentra entre las posiciones 1 y 652 de la SEQ ID NO: 3. El segundo cebador correspondiente de un par de cebadores comprende por lo menos
60 15, por lo menos 18, por lo menos 20, por lo menos 21 o por lo menos 24 nucleótidos consecutivos, que se escogen a partir de la secuencia complementaria de nucleótidos entre las posiciones 1.600 y 1.118 de la SEQ ID NO: 3. Si se desea la amplificación de la región codificadora, entonces el par de cebadores se escoge de manera preferida a partir de la secuencia de nucleótidos, que se encuentra entre las posiciones 1 y 334 de la SEQ ID NO: 3 y a partir de la secuencia complementaria de nucleótidos que se encuentra entre las posiciones 1.600 y 1.292 de la SEQ ID NO:
65 3. Si se desea la amplificación de una parte de la región codificadora, tal como se representa en las SEQ ID NO: 15

y 17, entonces el par de cebadores se escoge de manera preferida a partir de la secuencia de nucleótidos que se encuentra entre las posiciones 335 y 652 de la SEQ ID NO: 3 y a partir de la secuencia complementaria de nucleótidos que se encuentra entre las posiciones 1.291 y 1.118 de la SEQ ID NO: 3.

5 Unos adecuados pares de cebadores son, por ejemplo, el par de cebadores *opcA-A1* y *opcA-E1*, reproducido bajo las SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 y el par de cebadores *opcA-int1* y *opcA-int2* reproducido bajo las SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14. El cebador puede ser provisto además de unos sitios de reconocimiento para enzimas de restricción, de un grupo de biotina o de otros elementos accesorios, tales como los que se describen dentro del estado de la técnica. La longitud total del cebador es por lo general como máximo de 30, 40, 50 ó 60 nucleótidos.

10 Para la producción de polinucleótidos mediante amplificación de unas secuencias escogidas, tales como las del alelo *opcA* conforme al invento, a partir de un ADN dispuesto previamente, por ejemplo cromosomal (ADN de molde), mediante amplificación por medio de una PCR, se emplean por lo general unas polimerasas de ADN termoestables. Ejemplos de tales polimerasas de ADN son la polimerasa Taq procedente de *Thermus aquaticus*, que es distribuida, entre otras, por la entidad Qiagen (Hilden, Alemania), la polimerasa Vent de *Thermococcus litoralis*, que es distribuida, entre otras, por la entidad New England Biolabs (Francfort, Alemania) o la polimerasa Pfu de *Pyrococcus furiosus*, que es distribuida, entre otras, por la entidad Stratagene (La Jolla, EE.UU.). Se prefieren unas polimerasas con una actividad de lectura de comprobación (en inglés "proof-reading"). El concepto de "lectura de comprobación" significa que estas polimerasas están en la situación de reconocer a los nucleótidos que han sido introducidos erróneamente y de solventar el error mediante una polimerización renovada (Lottspeich y Zorbas, *Bioanalytik*, editorial Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Alemania (1998)). Ejemplos de polimerasas con actividad de lectura de comprobación son la polimerasa Vent y la polimerasa Pfu.

25 Las condiciones en la tanda de reacción se ajustan según los datos del fabricante. Las polimerasas son proporcionadas por el fabricante por lo general en común con el tampón habitual, que tiene usualmente unas concentraciones de 10 - 100 mM de Tris/HCl y de 6 - 55 mM de KCl, a un pH de 7,5 - 9,3. El cloruro de magnesio se añade en una concentración de 0,5 - 10 mM, en el caso de que no esté contenido en el tampón suministrado por el fabricante. A la tanda de reacción se le añaden además desoxinucleósido-trifosfatos en una concentración de 0,1 - 16,6 mM. Los cebadores se disponen previamente en la tanda de reacción con una concentración final de 0,1 - 3 μ M y el ADN de molde, en el caso óptimo, con 10^2 hasta 10^5 copias. También se pueden emplear de 10^6 hasta 10^7 copias. La correspondiente polimerasa se añade a la tanda de reacción en una cantidad de 2-5 unidades. Una típica tanda de reacción tiene un volumen de 20 - 100 μ l.

35 Como otras adiciones se pueden añadir a la reacción albúmina de suero bovino, Tween-20, gelatina, glicerol, formamida o DMSO (Dieffenbach y Dveksler, *PCR Primer - A Laboratory Manual* (Cebadores de PCR - Un manual de laboratorio), Cold Spring Harbor Laboratory Press, EE.UU. 1995).

40 Una típica evolución de la PCR se compone de tres diferentes escalones de temperatura, que se repiten consecutivamente. De antemano, la reacción se inicia con un aumento de la temperatura a 92°C - 98°C durante 4 a 10 minutos, con el fin de desnaturalizar el ADN dispuesto previamente. Luego siguen, repitiéndose, en primer lugar una etapa para la desnaturalización del ADN dispuesto previamente durante 10 - 60 segundos a aproximadamente 92 - 98°C, luego una etapa para la unión de los cebadores al ADN dispuesto previamente durante 10 - 60 segundos a una determinada temperatura, que depende de los cebadores (temperatura de reanillamiento = en inglés "annealing temperature"), que está situada, conforme a la experiencia, en 50°C hasta 60°C, y que se puede calcular individualmente para cada par de cebadores. Informaciones exactas acerca de esto las encontrará un experto en la especialidad en la cita de Rychlik y colaboradores (*Nucleic Acids Research* 18 (21): 6409-6412). A continuación sigue una etapa de síntesis para la prolongación del cebador dispuesto previamente (extensión) en el valor óptimo de la actividad que se indica en cada caso para la polimerasa, que usualmente, según sea la polimerasa, está situada en el intervalo de 73°C a 67°C, de manera preferida de 72°C a 68°C. La duración de esta etapa de extensión depende de la productividad de la polimerasa y de la longitud del producto de PCR que debe de ser amplificado. En una típica PCR, esta etapa dura 0,5 - 8 minutos, de manera preferida 2 - 4 minutos. Estas tres etapas se repiten de 30 hasta 35 veces, eventualmente hasta 50 veces. Una etapa final de extensión durante 4 - 10 minutos finaliza la reacción. Los polinucleótidos producidos de esta manera son designados también como materiales amplificados; el concepto de fragmento de ácido nucleico es asimismo habitual.

55 Otras instrucciones e informaciones adicionales acerca la PCR las encontrará un experto en la especialidad, por ejemplo, en el manual "PCR-Strategies" (Estrategias de PCR) (Innis, Felfand y Sninsky, Academic Press, Inc., 1995), en el manual de Dieffenbach y Dveksler "PCR Primer - a laboratory manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995), en el manual de Gait "Oligonucleotide synthesis: A Practical Approach" (Síntesis de oligonucleótidos: un enfoque práctico) (IRL Press, Oxford, Reino Unido 1984) y en la cita de Newton y Graham "PCR" (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Alemania, 1994).

65 La secuencia de nucleótidos se determina a continuación, por ejemplo, según el procedimiento de rotura de la cadena de Sanger y colaboradores (Proceedings of the National Academies of Sciences, EE.UU., 74, 5463-5467 (1977)) con las modificaciones indicadas por Zimmermann y colaboradores (*Nucleic Acids Research* 18, páginas 1067 y siguientes (1990)), y se analiza el polipéptido codificado por esta secuencia de nucleótidos en particular en lo

que respecta a la secuencia de aminoácidos. Para esto, la secuencia de nucleótidos se introduce en un programa para la traducción de una secuencia de ADN en una secuencia de aminoácidos. Unos programas adecuados son, por ejemplo, el programa "Patentin", que es obtenible de las oficinas de patentes, por ejemplo, de la Oficina de patentes de los EE.UU. (USPTO), o la herramienta de traducción "Translate Tool", que está disponible en el Servidor ExpASy Proteomics en el world wide web (internet) (Gasteiger y colaboradores, Nucleic Acids Research 31, 3784-3788 (2003).

De esta manera se identifican unos mutantes, cuyos alelos opcA codifican los polipéptidos OpcA, que contienen las mutaciones conformes al invento.

De modo correspondiente, es un objeto del invento un mutante de una bacteria corineforme, que es obtenible mediante las siguientes etapas:

- a) tratamiento de una bacteria corineforme, que posee la capacidad de segregar aminoácidos, con un agente mutágeno,
- b) aislamiento y multiplicación del mutante producido en a)
- c) de manera preferida, determinación de la capacidad del mutante para segregar por lo menos un 0,5 % más de un aminoácido a un medio, o de enriquecerlo en el interior de las células como las de la bacteria corineforme empleada en a),
- d) puesta a disposición de un ácido nucleico procedente del mutante obtenido en b)
- e) producción de una molécula de ácido nucleico / un material amplificado / un fragmento de ácido nucleico mediando utilización de la reacción en cadena de la polimerasa, del ácido nucleico procedente de d), y de un par de cebadores, que se compone de un primer cebador, que comprende por lo menos 15 nucleótidos consecutivos que se escogen a partir de la secuencia de nucleótidos que se encuentra entre las posiciones 1 y 334 de la SEQ ID NO: 3, y de un segundo cebador, que comprende por lo menos 15 nucleótidos consecutivos, que se escogen a partir de la secuencia complementaria de nucleótidos que se encuentra entre las posiciones 1.600 y 1.292 de la SEQ ID NO: 3,
- f) determinación de la secuencia de nucleótidos de la molécula de ácidos nucleicos obtenida en e), y determinación de la secuencia de aminoácidos codificada.
- g) eventualmente comparación de la secuencia de aminoácidos determinada en f) con la SEQ ID NO: 6, e
- h) identificación de un mutante, que contiene un polinucleótido, que codifica un polipéptido, cuya secuencia de aminoácidos se compone de la SEQ ID NO: 6, en la que
 - i) en la posición 107 de la secuencia de aminoácidos se encuentra L-histidina,
 - ii) en la posición 219 de la secuencia de aminoácidos se encuentra L-asparagina,
 - iii) en la posición 233 de la secuencia de aminoácidos se encuentra L-serina, y
 - iv) en la posición 261 de la secuencia de aminoácidos se encuentra L-histidina.

Los mutantes obtenidos de este modo contienen típicamente una (1) copia de uno de los alelos opcA que se han descrito. El procedimiento aquí descrito es asimismo un objeto del invento.

En la SEQ ID NO: 5 se reproducen a modo de ejemplo las regiones codificadoras de un alelo opcA de un mutante conforme al invento. La región codificadora del gen de tipo silvestre se reproduce como la SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 1 contiene en las posiciones 319 hasta 321 el codón TAT que codifica el aminoácido L-tirosina. La SEQ ID NO: 5 contiene en la posición 319 la nucleobase citosina. Por medio de esta transición de timina a citosina resulta en las posiciones 319 hasta 321 el codón CAT que codifica el aminoácido L-histidina.

La SEQ ID NO: 1 contiene en las posiciones 655 hasta 657 el codón AAA que codifica el aminoácido L-lisina. La SEQ ID NO: 5 contiene en la posición 657 la nucleobase citosina. Por medio de esta transición de adenina a citosina resulta en las posiciones 655 hasta 657 el codón AAC que codifica el aminoácido L-asparagina.

La SEQ ID NO: 1 contiene en las posiciones 697 hasta 699 el codón CCA que codifica el aminoácido L-prolina. La SEQ ID NO: 5 contiene en la posición 697 la nucleobase timina. Por medio de esta transición de citosina a timina en resulta en las posiciones 697 hasta 699 el codón TCA que codifica el aminoácido L-serina.

La SEQ ID NO: 1 contiene en las posiciones 781 hasta 783 el codón TAT que codifica el aminoácido L-tirosina. La SEQ ID NO: 5 contiene en la posición 781 la nucleobase citosina. Por medio de esta transición de timina a citosina, resulta en las posiciones 781 hasta 783 el codón CAT que codifica el aminoácido L-histidina.

5 Además de esto, la secuencia de nucleótidos representada en la SEQ ID NO: 5 puede contener otros intercambios de bases, que resultan por medio del tratamiento de mutagénesis, pero que no se exteriorizan en una secuencia modificada de aminoácidos.

10 Tales mutaciones son designadas en el mundo especializado también como mutaciones mudas o neutras. Estas mutaciones mudas pueden estar contenidas asimismo en la bacteria corineforme que se emplea para el tratamiento de mutagénesis. Ejemplos de tales mutaciones mudas son la transición de citosina a timina en la posición 402, la transición de timina a citosina en la posición 600 y la transversión de guanina a citosina en la posición 648 tal como se representa en la SEQ ID NO: 7.

15 Las bacterias corineformes utilizadas para la mutagénesis poseen de manera preferida ya la capacidad de segregar el aminoácido deseado en el medio nutritivo que lo rodea o respectivamente en el caldo de fermentación, o de enriquecerlo en el interior de las células.

20 Las bacterias corineformes que producen L-lisina, poseen típicamente una aspartato cinasa resistente a la retroalimentación (en inglés "feed back") o respectivamente desensibilizada. Por el concepto de "aspartato cinasas resistentes frente a la retroalimentación" se entienden unas aspartato cinasas que, en comparación con la forma silvestre, tienen una sensibilidad más pequeña frente a la inhibición por mezclas de lisina y treonina o por mezclas de AEC (aminoetilcisteína) y treonina, o por lisina a solas o por AEC a solas. Los genes o respectivamente alelos que codifican estas aspartato cinasas desensibilizadas son designados también como alelos lysC^{FBR}. Dentro del estado de la técnica (Tabla 1) se describen numerosos alelos lysC^{FBR}, que codifican unas variantes de la aspartato cinasa, que poseen intercambios de aminoácidos en comparación con la proteína de tipo silvestre. La región codificadora del gen lysC de tipo silvestre de *Corynebacterium glutamicum* correspondiente al número de acceso AX756575 del banco de datos NCBI se representa en la SEQ ID NO: 19 y la proteína codificada por este gen se representa en la SEQ ID NO: 20.

30

Tabla 1
Alelos lysC^{FBR}, que codifican aspartato cinasas resistentes frente a la retroalimentación

Designación del alelo	Otros datos	Referencia	Número de acceso
lysC ^{FBR} -E05108		documento JP 1993184366-A (secuencia 1)	E05108
lysC ^{FBR} -E06825	lysC A279T	documento JP 1994062866-A (secuencia 1)	E06825
lysC ^{FBR} -E06826	lysC A279T	documento JP 1994062866-A (secuencia 2)	E06826
lysC ^{FBR} -E06827		documento JP 1994062866-A (secuencia 3)	E06827
lysC ^{FBR} -E08177		documento JP 1994261766-A (secuencia 1)	E08177
lysC ^{FBR} -E08178	lysC A279T	documento JP 1994261766-A (secuencia 2)	E08178
lysC ^{FBR} -E08179	lysC A279V	documento JP 1994261766-A (secuencia 3)	E08179
lysC ^{FBR} -E08180	lysC S301F	documento JP 1994261766-A (secuencia 4)	E08180
lysC ^{FBR} -E08181	lysC T308I	documento JP 1994261766-A (secuencia 5)	E08181
lysC ^{FBR} -E08182		documento JP 1994261766-A (secuencia 6)	E08182
lysC ^{FBR} -E12770		documento JP 1997070291-A (secuencia 13)	E12770
lysC ^{FBR} -E14514		documento JP 1997322774-A (secuencia 9)	E14514
lysC ^{FBR} -E16352		documento JP 1998165180-A (secuencia 3)	E16352
lysC ^{FBR} -E16745		documento JP 1998215883-A (secuencia 3)	E16745
lysC ^{FBR} -E16746		documento JP 1998215883-A (secuencia 4)	E16746

Designación del alelo	Otros datos	Referencia	Número de acceso
lysC ^{FBR} -I74588		documento US 5688671-A (secuencia 1)	I74588
lysC ^{FBR} -I74589	lysC A279T	documento US 5688671-A (secuencia 2)	I74589
lysC ^{FBR} -I74590		documento US 5688671-A (secuencia 7)	I74590
lysC ^{FBR} -I74591	lysC A279T	documento US 5688671-A (secuencia 8)	I74591
lysC ^{FBR} -I74592		documento US 5688671-A (secuencia 9)	I74592
lysC ^{FBR} -I74593	lysC A279T	documento US 5688671-A (secuencia 10)	I74593
lysC ^{FBR} -I74594		documento US 5688671-A (secuencia 11)	I74594
lysC ^{FBR} -I74595	lysC A279T	documento US 5688671-A (secuencia 12)	I74595
lysC ^{FBR} -I74596		documento US 5688671-A (secuencia 13)	I74596
lysC ^{FBR} -I74597	lysC A279T	documento US 5688671-A (secuencia 14)	I74597
lysC ^{FBR} -X57226	lysC S301Y	documento EP 0387527 Kalinowski y colaboradores, Molecular and General Genetics 224:317-324 (1990)	X57226
lysC ^{FBR} -L16848	lysC G345D	Folletie y Sinskey Base de datos de nucleótidos NCBI (1990)	L16848
lysC ^{FBR} -L27125	lysC R320G lysC G345D	Jetten y colaboradores, Applied Microbiology Biotechnology 43:76-82 (1995)	L27125
lysC ^{FBR}	lysC T311I	documento WO0063388 (secuencia 17)	
lysC ^{FBR}	lysC S301F	documento US 3732144	
lysC ^{FBR}	lysC S381F	documento EP 0435132	
lysC ^{FBR}	lysC S317A	documento US 5688671 (secuencia 1)	
lysC ^{FBR}	lysC T380I	documento WO 01/49854	

Las bacterias corineformes que segregan L-lisina, poseen típicamente uno o varios de los intercambios de aminoácidos expuestos en lista en la Tabla 1.

- 5 Se prefieren los siguientes alelos lysC^{FBR}: lysC A279T (intercambio de alanina en la posición 279 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 20 por treonina), lysC A279V (intercambio de alanina en la posición 279 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 20 por valina), lysC S301F (intercambio de serina en la posición 301 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 20 por fenilalanina), lysC T308I (intercambio de treonina en la posición 308 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 20 por isoleucina), lysC S301Y (intercambio de serina en la posición 308 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 20 por tirosina), lysC G345D (intercambio de glicina en la posición 345 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 20 por ácido aspártico), lysC R320G (intercambio de arginina en la posición 320 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 20 por glicina), lysC T311I (intercambio de treonina en la posición 311 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 20 por isoleucina), lysC S381F (intercambio de serina en la posición 381 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 20 por fenilalanina) y lysC S317A (intercambio de serina en la posición 317 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 20 por alanina).
- 10
- 15
- 20 Se prefieren especialmente el alelo lysC^{FBR} lysC T311I (intercambio de treonina en la posición 311 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 20 por isoleucina), y un alelo lysC^{FBR} que contiene por lo menos un intercambio, que se escoge entre el conjunto que se compone de A279T (intercambio de alanina en la posición 279 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 20 por treonina) y de S317A (intercambio de serina en la posición 317 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 20 por alanina).
- 25

El alelo $lysC^{FBR}$ $lysC$ T3111 está contenido en la cepa DM1797 depositada en la DSMZ bajo el número DSM16833. El DM1797 es un mutante de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032.

- 5 Un alelo $lysC^{FBR}$ que contiene el intercambio de aminoácidos A279T está contenido en el mutante que ha sido depositado en la NRRL bajo el número NRRL B-11474.

Según el modo descrito más arriba, partiendo de la cepa DM1797, se aísla un mutante designado como DM1825, que contiene un alelo $opcA$, que codifica un polipéptido $OpcA$, en el que en la posición 107 de la secuencia de aminoácidos está contenida L-histidina, en la posición 219 está contenida L-asparagina, en la posición 233 está contenida L-serina y en la posición 261 está contenida L-histidina. La secuencia de nucleótidos de la región codificadora del alelo $opcA$ del mutante DM1825 se representa como la SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado se representa como la SEQ ID NO: 8 o respectivamente 10. La SEQ ID NO: 7 contiene en la posición 319 citosina en lugar de timina, en la posición 402 timina en lugar de citosina, en la posición 600 citosina en lugar de timina, en la posición 648 citosina en lugar de guanina, en la posición 657 citosina en lugar de adenina, en la posición 697 timina en lugar de citosina y en la posición 781 citosina en lugar de timina. La formulación "en la posición 648 contiene citosina en lugar de guanina" - y otras formulaciones comparables - significa(n) que la nucleobase guanina que está presente en la secuencia de tipo silvestre de la región codificadora en la posición 648 (véase la SEQ ID NO: 1) ha sido reemplazada por citosina (véase la SEQ ID NO: 7).

20 En la SEQ ID NO: 9 se indican las secuencias de nucleótidos que están situadas corriente arriba (en inglés "upstream") y corriente abajo (en inglés "downstream") de la SEQ ID NO: 7.

25 Además de esto, se pueden utilizar unas bacterias corineformes que segregan L-lisina, las cuales tienen una homoserina deshidrogenasa o una homoserina cinasa debilitada o poseen otras propiedades distintas, tales como las que se conocen a partir del estado de la técnica.

Las bacterias corineformes que producen L-triptófano, poseen típicamente una antranilato sintasa resistente a la retroalimentación o respectivamente desensibilizada. Por el concepto de "antranilato sintasa resistente a la retroalimentación" se entienden unas antranilato sintasas que, en comparación con la forma silvestre, tienen una sensibilidad más pequeña frente a la inhibición (de 5 % a 10 %, de 10 % a 15 % o de 10 % a 20 %) por triptófano o 5-fluorotriptófano (Matsui y colaboradores, *Journal of Bacteriology* 169 (11): 5330 - 5332 (1987)) o por compuestos análogos similares. Los genes o respectivamente alelos, que codifican estas antranilato sintasas desensibilizadas, son designados como alelos $trpE^{FBR}$. Ejemplos de tales mutantes o respectivamente alelos se describen, por ejemplo, en los documentos US 6180373 y EP 0338474.

Los mutantes obtenidos muestran, en comparación con la cepa de partida o respectivamente con la cepa parental empleada, una segregación o respectivamente una producción aumentadas del aminoácido deseado en un proceso de fermentación.

40 Es un objeto del invento asimismo un polinucleótido aislado, que codifica un polipéptido $OpcA$ de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que está caracterizado porque la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6 del polipéptido tiene los siguientes aminoácidos:

- 45 a) L-histidina en la posición 107 de la secuencia de aminoácidos,
 b) L-asparagina en la posición 219 de la secuencia de aminoácidos,
 50 c) L-serina en la posición 233 de la secuencia de aminoácidos, y
 d) L-histidina en la posición 261 de la secuencia de aminoácidos.

El polinucleótido conforme al invento se puede aislar a partir de un mutante conforme al invento.

55 Además, para la mutagénesis del gen $opcA$ se pueden emplear ciertos métodos *in vitro*. En el caso de la utilización de métodos *in vitro*, unos polinucleótidos aislados, que contienen un gen $opcA$ de una bacteria corineforme, de manera preferida el gen de tipo silvestre de *Corynebacterium glutamicum* que se ha descrito en el estado de la técnica, son sometidos a un tratamiento mutágeno.

60 En el caso de los polinucleótidos aislados se puede tratar por ejemplo del ADN total aislado o respectivamente del ADN cromosomal aislado o también de unos materiales amplificados del gen $opcA$, que se produjeron con ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Tales materiales amplificados son designados también como productos de la PCR; el concepto de "fragmento de ácido nucleico" es asimismo habitual. Unas instrucciones para realizar la amplificación de secuencias de ADN con ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa las encontrará un experto en la especialidad, entre otros, en el manual de Gait: *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (Síntesis de oligonucleótidos: una aproximación práctica) (IRL Press, Oxford, Reino Unido, 1984) y en la cita de

Newton y Graham: PCR (editorial Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Alemania, 1994). Asimismo es posible, introducir el gen *opcA* que debe de ser mutagenizado, primeramente en un vector, por ejemplo en un bacteriofago o en un plásmido.

5 Unos métodos adecuados para realizar la mutagénesis in vitro son, entre otros, el tratamiento con hidroxilamina según Miller (Miller, J. H.: A Short Course in Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria (Un breve curso de genética bacteriana. Un manual de laboratorio y un manual para *Escherichia coli* y bacterias relacionadas con ella), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1992), la utilización de oligonucleótidos mutágenos (T. A. Brown: *Gentechnologie für Einsteiger* (Tecnología genética para principiantes) editorial Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1993 y R. M. Horton: PCR-mediated Recombination and Mutagenesis (Recombinación y mutagénesis mediadas por PCR), *Molecular Biotechnology* 3, 93-99 (1995) y el empleo de una reacción en cadena de la polimerasa mediante utilización de una polimerasa de ADN, que tiene una alta tasa de errores. Una tal polimerasa de ADN es, por ejemplo, la polimerasa de ADN Mutazyme (estuche para mutagénesis GeneMorph PCR, n° 600550) de la entidad Stratagene (LaJolla, CA, EE.UU.).

15 Instrucciones y recopilaciones adicionales acerca de la producción de mutaciones in vivo o in vitro se pueden tomar del estado de la técnica y de los libros de texto conocidos de genética y de biología molecular, tales como por ejemplo el libro de texto de Knippers ("*Molekulare Genetik*" (Genética molecular), 6ª edición, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Alemania, 1995)), el de Winnacker ("*Gene und Klone*" (Genes y clones), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1990) o el de Hagemann ("*Allgemeine Genetik*" (Genética general), editorial Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986).

20 Un objeto del invento es además un polinucleótido aislado, que codifica un polipéptido *OpcA*, que contiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 con una longitud de 319 aminoácidos y que contiene los siguientes aminoácidos

- 25 a) L-histidina en la posición 107
- b) L-asparagina en la posición 219
- 30 c) L-serina en la posición 233, y
- d) L-histidina en la posición 261.

35 Un objeto del invento es además un polinucleótido aislado, que codifica un polipéptido *OpcA*, que contiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 98 hasta 270 de la SEQ ID NO: 6 o a las posiciones 83 hasta 285 de la SEQ ID NO: 6 o a las posiciones 63 hasta 305 de la SEQ ID NO: 6 o a las posiciones 38 hasta 315 de la SEQ ID NO: 6 o a las posiciones 8 hasta 315 de la SEQ ID NO: 6 o a las posiciones 2 hasta 315 de la SEQ ID NO: 6 o a las posiciones 2 hasta 317 de la SEQ ID NO: 6 o a las posiciones 2 hasta 319 de la SEQ ID NO: 6. De manera muy especialmente preferida, la longitud del polipéptido codificado abarca los 319 aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

40 Un objeto del invento es además un polinucleótido aislado, que codifica un polipéptido *OpcA*, que está caracterizado porque la secuencia de aminoácidos del polipéptido se compone de la SEQ ID NO: 6, en la que

- 45 a) en la posición 107 de la secuencia de aminoácidos se encuentra L-histidina,
- b) en la posición 219 de la secuencia de aminoácidos se encuentra L-asparagina,
- 50 c) en la posición 233 de la secuencia de aminoácidos se encuentra L-serina, y
- d) en la posición 261 de la secuencia de aminoácidos se encuentra L-histidina,

55 y que abarca una secuencia de nucleótidos, que es idéntica a la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido, que es obtenible mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante utilización del par de cebadores, cuyas secuencias de nucleótidos abarcan en cada caso por lo menos 15 nucleótidos consecutivos, que se escogen a partir de la secuencia de nucleótidos, que se encuentra entre las posiciones 1 y 334 de la SEQ ID NO: 3 y a partir de la secuencia complementaria de nucleótidos, que se encuentra entre las posiciones 1.600 y 1.292 de la SEQ ID NO: 3. Un ejemplo de un adecuado par de cebadores se expone en las SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12. Como material de partida (ARN de molde) se prefiere un ADN cromosomal de bacterias corineformes, que han sido tratadas en particular con un agente mutágeno. Se prefiere especialmente el ADN cromosomal del género *Corynebacterium* y se prefiere muy especialmente el de la especie *Corynebacterium glutamicum*.

60 Además, es un objeto del invento un polinucleótido aislado, que se hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos complementaria con la SEQ ID NO: 5 o 7, y que codifica un polipéptido *OpcA*, cuya secuencia de aminoácidos se compone de la SEQ ID NO: 6, en la que

- 5
- a) en la posición 107 de la secuencia de aminoácidos se encuentra L-histidina,
 - b) en la posición 219 de la secuencia de aminoácidos se encuentra L-asparagina,
 - c) en la posición 233 de la secuencia de aminoácidos se encuentra L-serina, y
 - d) en la posición 261 de la secuencia de aminoácidos se encuentra L-histidina,

10 Instrucciones para realizar la hibridación de ácidos nucleicos o respectivamente de polinucleótidos, las puede encontrar un experto en la especialidad, entre otros, en el manual "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" (Guía para usuarios del sistema DIG para la hibridación en filtro) de la entidad Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania, 1993) y en la cita de Liebl y colaboradores (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). La hibridación tiene lugar en condiciones rigurosas, es decir, que sólo se forman

15 unos híbridos, en los que la sonda, es decir un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos complementaria a las SEQ ID NO: 5, 7 o 9 y la secuencia diana, es decir los polinucleótidos que han sido tratados o respectivamente identificados con la sonda, son idénticas por lo menos en un 90 %. Es conocido que la rigurosidad de la hibridación, inclusive las etapas de lavado, puede ser influida o respectivamente determinada mediante variación de la composición del tampón, de la temperatura y de la concentración de sales. La reacción de hibridación

20 se lleva a cabo en general con una rigurosidad relativamente baja en comparación con las etapas de lavado (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, Reino Unido, 1996).

25 Para la reacción de hibridación se puede emplear, por ejemplo, un tampón correspondiente al tampón 5x SSC, a una temperatura de aproximadamente 50°C - 68°C. En este caso, unas sondas se pueden hibridar también con unos polinucleótidos, que tienen una identidad de menos que un 90 % con la secuencia de nucleótidos de la sonda empleada. Tales híbridos son menos estables y son eliminados mediante lavado en condiciones rigurosas. Esto se puede conseguir, por ejemplo, mediante disminución de la concentración de sales hasta 2x SSC y eventualmente a continuación hasta 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania, 1995), ajustándose una temperatura de aproximadamente 50°C - 68°C, aproximadamente

30 52°C - 68°C, aproximadamente 54°C - 68°C, aproximadamente 56°C - 68°C, aproximadamente 58°C - 68°C, aproximadamente 60°C - 68°C, aproximadamente 62°C - 68°C, aproximadamente 64°C - 68°C y aproximadamente 66°C - 68°C. Se prefieren los intervalos de temperaturas de aproximadamente 64°C - 68°C o aproximadamente 66°C - 68°C. Eventualmente es posible disminuir la concentración de sales hasta una concentración correspondiente a 0,2x SSC o 0,1x SSC. Eventualmente, el tampón SSC contiene dodecilsulfato de sodio (SDS) en una

35 concentración de 0,1 %. Mediante un aumento escalonado de la temperatura de hibridación en escalones de aproximadamente 1 - 2°C, desde 50°C hasta 68°C, se pueden aislar unos fragmentos de polinucleótidos, que poseen una identidad de por lo menos un 90 % o de por lo menos un 91 %, de manera preferida de por lo menos un 92 % o por lo menos un 93 % o por lo menos un 94 % o por lo menos un 95 % o por lo menos un 96 %, y de manera especialmente preferida de por lo menos un 97 % o por lo menos un 98 % o por lo menos un 99 % con la secuencia

40 o respectivamente con la secuencia complementaria de la sonda empleada, y que codifican un polipéptido OpcA, que contiene el intercambio de aminoácidos conforme al invento. La secuencia de nucleótidos del polinucleótido obtenido de esta manera se determina con métodos conocidos. Otras instrucciones para realizar la hibridación son obtenibles en el mercado en forma de los denominados estuches (por ejemplo el DIG Easy Hyb de la entidad Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, n° de catálogo 1603558). Las secuencias de nucleótidos obtenidas de esta manera codifican unos polipéptidos OpcA, que son idénticos en por lo menos un 90 %, de manera preferida en por lo menos un 92 % o por lo menos un 94 % o por lo menos un 96 %, y de manera muy especialmente preferida en por lo menos un 97 % o por lo menos un 98 % o por lo menos un 99 % con la secuencia de aminoácidos de las

45 SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 2, que contienen cuatro intercambios de aminoácidos conformes al invento.

50 Un objeto del invento es además un polinucleótido aislado, que codifica el polipéptido de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, escogiéndose la secuencia de aminoácidos del polipéptido entre el conjunto que se compone de

- 55
- a) la SEQ ID NO: 6, en la que en la posición 107 de la secuencia de aminoácidos se encuentra L-histidina en la posición 219 se encuentra L-asparagina en la posición 233 se encuentra L-serina y en la posición 261 se encuentra L-histidina
 - b) la SEQ ID NO: 6, en la que, aparte de las mencionadas mutaciones, se encuentran como máximo 5 intercambios conservativos de aminoácidos y
 - 60 c) la SEQ ID NO: 6, en la que, aparte de las mencionadas mutaciones, se encuentran como máximo 5 inserciones o supresiones.

Un objeto del invento es además un polinucleótido aislado, que codifica un polipéptido OpcA, que está caracterizado porque la secuencia de aminoácidos del polipéptido se compone de la SEQ ID NO: 6, en la que

65

- a) en la posición 107 de la secuencia de aminoácidos se encuentra L-histidina,

- b) en la posición 219 de la secuencia de aminoácidos se encuentra L-asparagina,
- c) en la posición 233 de la secuencia de aminoácidos se encuentra L-serina,
- d) en la posición 261 de la secuencia de aminoácidos se encuentra L-histidina, Un objeto del invento es además un polinucleótido aislado

y que abarca una secuencia de nucleótidos, que además es idéntica por lo menos en un 90 %, de manera preferida por lo menos en un 92 % o por lo menos en un 94 % o por lo menos en un 96 %, y de manera muy especialmente preferida por lo menos en un 97 % o por lo menos en un 98 % o por lo menos en un 99 % a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5.

Un ejemplo de un polinucleótido, que codifica un polipéptido OpcA conforme al invento, y que posee una secuencia de nucleótidos, que es idéntica por lo menos en un 99 % A la SEQ ID NO: 5, se expone en la SEQ ID NO: 7. La secuencia de nucleótidos de este alelo opcA posee, adicionalmente a los intercambios de nucleótidos de timina por citosina en la posición 319, de adenina por citosina en la posición 657, de citosina por timina en la posición 697 y de timina por citosina en la posición 781 (véase la SEQ ID NO: 5), los intercambios de nucleótidos de citosina por timina en la posición 402, de timina por citosina en la posición 600, y de guanina por citosina en la posición 648 (véase la SEQ ID NO: 7). La formulación "de guanina por citosina en la posición 648" - y formulaciones comparables - significa(n) que la nucleobase guanina, que está presente en la posición 648 en la secuencia de tipo silvestre de la región codificadora (véase la SEQ ID NO: 1) ha sido reemplazada por citosina (véase la SEQ ID NO: 7).

Un objeto del invento es además un polinucleótido aislado, que codifica un polipéptido OpcA, que abarca la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 inclusive una prolongación junto al terminal de N o C en por lo menos un (1) aminoácido. Esta prolongación no es de más que 50, 40, 30, 20, 10, 5, 3 ó 2 aminoácidos o respectivamente restos de aminoácidos.

Un objeto del invento es además un polinucleótido aislado, que abarca la secuencia de nucleótidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 5 o 7.

Un objeto del invento es finalmente un polinucleótido aislado, que contiene el alelo opcA del mutante DM1825.

Un objeto del invento es además un polinucleótido aislado, que abarca una parte de la región codificadora de un alelo opcA conforme al invento, abarcando el polinucleótido aislado en cualquier caso la parte de la región codificadora que contiene los cuatro intercambios de aminoácidos conformes al invento. El concepto de "la parte de la región codificadora" significa que o bien el codón de inicio (típicamente ATG o GTG), o el último codón codificador (en el presente caso GTC correspondientemente a las posiciones 955 - 957 de la SEQ ID NO: 5), o los dos, están ausentes en el polinucleótido aislado.

Se prefieren unas moléculas de ácidos nucleicos, que codifican por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 98 hasta 270 de la SEQ ID NO: 6, o por lo menos correspondiente a las posiciones 83 hasta 285 de la SEQ ID NO: 6, o por lo menos correspondiente a las posiciones 63 hasta 305 de la SEQ ID NO: 6, o por lo menos correspondiente a las posiciones 38 hasta 315 de la SEQ ID NO: 6, o por lo menos correspondiente a las posiciones 8 hasta 315 de la SEQ ID NO: 6.

El marco de lectura, que codifica la secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 98 hasta 270 de la SEQ ID NO: 6 se representa asimismo como la SEQ ID NO: 15. La SEQ ID NO: 16 muestra la secuencia de aminoácidos codificada por este marco de lectura. La posición 10 en la SEQ ID NO: 16 corresponde a la posición 107 de las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 ó 10. La posición 122 en la SEQ ID NO: 16 corresponde a la posición 219 de las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 ó 10. La posición 136 en la SEQ ID NO: 16 corresponde a la posición 233 de las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 ó 10. La posición 164 en la SEQ ID NO: 16 corresponde a la posición 261 de las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 ó 10.

Se prefieren muy especialmente unas moléculas de ácidos nucleicos, que abarcan por lo menos una secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 292 hasta 810 de las SEQ ID NO: 5 ó 7, o por lo menos una secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 247 hasta 855 de las SEQ ID NO: 5 ó 7, o por lo menos una secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 187 hasta 915 de las SEQ ID NO: 5 ó 7, o por lo menos una secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 112 hasta 948 de las SEQ ID NO: 5 ó 7, o por lo menos una secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 22 hasta 948 de las SEQ ID NO: 5 ó 7.

El marco de lectura correspondiente a las posiciones 292 hasta 810 de la SEQ ID NO: 5 se representa como la SEQ ID NO: 15. La correspondiente secuencia de aminoácidos codificada se representa como la SEQ ID NO: 16. El marco de lectura correspondiente a las posiciones 292 hasta 810 de la SEQ ID NO: 7 se representa como la SEQ ID NO: 17. La correspondiente secuencia de aminoácidos codificada se representa como la SEQ ID NO: 18.

Los marcos de lectura conformes al invento pueden contener, además de esto, una o varias mutaciones, que dan lugar como máximo a cinco intercambios conservativos de aminoácidos. De manera preferida, las mutaciones dan lugar a como máximo un 4 %, como máximo un 2 % o como máximo un 1 % de intercambios conservativos de aminoácidos. Además, los marcos de lectura conformes al invento pueden contener una o varias mutaciones mudas. De manera preferida, los marcos de lectura conformes al invento contienen como máximo un 4 % y de manera especialmente preferida como máximo un 2 % hasta como máximo un 1 % de mutaciones mudas.

Los polinucleótidos aislados conformes al invento pueden ser utilizados para producir unas cepas recombinantes de microorganismos que, en comparación con la cepa de partida - o respectivamente con la cepa parental -, entregan de manera mejorada aminoácidos al medio circundante o los acumulan en el interior de las células.

Un método propagado para la incorporación de mutaciones en genes de bacterias corineformes es el del intercambio de alelos, que se conoce también bajo la designación "reemplazo de genes" (en inglés "gene replacement"). En el caso de este procedimiento, un fragmento de ADN, que contiene la mutación interesante, es transferido a la cepa deseada de una bacteria corineforme y la mutación es incorporada mediante por lo menos dos sucesos de recombinación o respectivamente dos sucesos de cruzamiento (en inglés "cross over") en el cromosoma de la cepa deseada o respectivamente la secuencia de un gen que está presente en la respectiva cepa, se intercambia por la secuencia mutada.

Este método fue utilizado por Schwarzer y Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)) para incorporar un alelo *lysA*, que llevaba una supresión, en el cromosoma de *C. glutamicum* en lugar del gen de tipo silvestre. De igual manera, se incorporó un alelo *lysA*, que llevaba una inserción, en el cromosoma de *C. glutamicum* en lugar del gen de tipo silvestre. Este método fue empleado por Schäfer y colaboradores (Gene 145, 69-73 (1994)) para incorporar una supresión en el operón *hom-thrB* de *C. glutamicum*. Este método fue empleado por Nakagawa y colaboradores (documento EP 1108790) y Ohnishi y colaboradores (Applied Microbiology and Biotechnology 58(2), 217-223 (2002)) para incorporar diferentes mutaciones partiendo de alelos aislados en el cromosoma de *C. glutamicum*. De esta manera, Nakagawa y colaboradores consiguieron incorporar una mutación designada como Val59Ala en el gen para la homoserina deshidrogenasa (*hom*), una mutación designada como Thr311Ile en el gen para la aspartato cinasa (*lysC* o respectivamente *ask*), una mutación designada como Pro458Ser en el gen para la piruvato carboxilasa (*pyc*) y una mutación designada como Ala213Thr en el gen para la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa designado como gen *zwf* de *C. glutamicum*.

Para un procedimiento conforme al invento se puede utilizar un polinucleótido conforme al invento, que abarca toda la región codificadora, tal como se expone por ejemplo en las SEQ ID NO: 5 ó 7, o que abarca una parte de la región codificadora, tal como, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos, que codifica por lo menos la secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 98 hasta 270 de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8, y que se representan como las SEQ ID NO: 15 y 17. La parte de la región codificadora correspondiente por lo menos a las SEQ ID NO: 15 ó 17 tiene una longitud de ≥ 519 nucleobases. Se prefieren aquellas partes de la región codificadora, que tienen una longitud de ≥ 747 nucleobases, tales como, por ejemplo, unas moléculas de ácidos nucleicos que codifican por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 63 hasta 305 de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8. Se prefieren muy especialmente aquellas partes de la región codificadora, cuya longitud es de ≥ 834 nucleobases, tales como por ejemplo unas moléculas de ácidos nucleicos que codifican por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 38 hasta 315 de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8.

El fragmento de ADN, que contiene la mutación interesante, se presenta en el caso de este método típicamente dentro de un vector, en particular un plásmido, que preferiblemente no es replicado o lo es sólo de un modo restringido por la cepa que debe de ser provista de la mutación. Como anfitrión auxiliar o intermedio, en el que es replicable el vector, se utiliza por lo general una bacteria del género *Escherichia*, de manera preferida de la especie *Escherichia coli*.

Ejemplos de tales vectores de plásmidos son los vectores pK**mob* y pK**mobsacB*, tales como, por ejemplo pK18*mobsacB*, descritos por Schäfer y colaboradores (Gene 145, 69-73 (1994)) y los vectores descritos en los documentos de solicitudes de patentes europeas WO 02/070685 y WO 03/014362. Éstos son replicativos en *Escherichia coli*, pero no en bacterias corineformes. Se adecuan especialmente unos vectores, que contienen un gen que actúa de un modo dominante negativo condicional, tal como, por ejemplo, el gen *sacB* (gen de la levano sucraza) de, por ejemplo, *Bacillus*, o el gen *galK* (gen de la galactosa cinasa) de, por ejemplo, *Escherichia coli*. (Por el concepto de "un gen, que actúa de un modo dominante negativo condicional" se entiende un gen, que en determinadas condiciones es desventajoso, por ejemplo tóxico, para el anfitrión, pero que en otras condiciones no tiene repercusiones negativas sobre el anfitrión que lleva el gen). Éstas hacen posible la selección en cuanto a unos sucesos de recombinación, en los que el vector es eliminado desde el cromosoma. Además, por Nakamura y colaboradores (documento US-A-6.303.383) se describió un plásmido sensible frente a la temperatura para bacterias corineformes, que sólo se puede replicar a unas temperaturas situadas por debajo de 31°C.

El vector es transferido a continuación por conjugación, por ejemplo según el método de Schäfer (Journal of Bacteriology 172, 1663-1666 (1990)) o por transformación, por ejemplo según el método de Dunican y Shivnan

(Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989) o según el método de Thierbach y colaboradores (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)) a la bacteria corineforme. Eventualmente, la transferencia del ADN se puede alcanzar también mediante un bombardeo con partículas.

5 Después de una recombinación homóloga por medio de un primer suceso de cruzamiento, que da lugar a una integración, y de un segundo adecuado suceso de cruzamiento, que da lugar a una excisión en el gen diana o respectivamente en la secuencia diana, se consigue la introducción de la mutación y se obtiene una bacteria recombinante.

10 Para realizar la identificación y la caracterización de las cepas obtenidas, se pueden emplear, entre otros, los métodos de la hibridación por transferencia de borrón Southern, la reacción en cadena de la polimerasa, la determinación de las secuencias, el método de la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia ("Fluorescence Resonance Energy Transfer", FRET) (Lay y colaboradores Clinical Chemistry 43, 2262-2267 (1997) o métodos de la enzimología.

15 Un objeto adicional de la descripción es, de modo correspondiente, un procedimiento para la producción de una bacteria corineforme, en el que

- 20 (a) se transfiere un polinucleótido conforme al invento a una bacteria corineforme
- (b) el gen *opcA*, que está presente en el cromosoma de la bacteria corineforme, que codifica una secuencia de aminoácidos con L-tirosina en la posición 107, L-lisina en la posición 219, L-prolina en la posición 233 y L-tirosina en la posición 261, se intercambia por el polinucleótido procedente de a),
- 25 (c) se multiplica y reproduce la bacteria corineforme obtenida de acuerdo con las etapas a) y b).

De esta manera se obtiene una bacteria corineforme recombinante que, en lugar del gen *opcA* de tipo silvestre, contiene un (1) alelo *opcA* conforme al invento.

30 Otro procedimiento para la producción de un microorganismo consiste en que

- a) se transfiere un polinucleótido conforme al invento, que contiene un polipéptido *opcA*, a un microorganismo,
- 35 b) se replica el polinucleótido en el microorganismo, y
- c) se multiplica y reproduce el microorganismo obtenido de acuerdo con las etapas a) y b).

40 De esta manera se obtiene un microorganismo recombinante, que contiene por lo menos una (1) copia o varias copias de un polinucleótido conforme al invento, que codifica un polipéptido *OpcA*, el cual está caracterizado porque la secuencia de aminoácidos del polipéptido tiene uno o varios de los aminoácidos, que se escogen entre el conjunto que se compone de:

- 45 a) L-histidina en la posición 107 de la secuencia de aminoácidos,
- b) L-asparagina en la posición 219 de la secuencia de aminoácidos,
- c) L-serina en la posición 233 de la secuencia de aminoácidos, y
- 50 d) L-histidina en la posición 261 de la secuencia de aminoácidos.

Otros objetos del invento son de modo correspondiente, anfitriones o respectivamente células anfitrionas, de manera preferida microorganismos, de manera especialmente preferida bacterias corineformes y bacterias del género *Escherichia*, que contienen los polinucleótidos conformes al invento. Asimismo, son objeto del invento unos microorganismos, que se habían producido mediante utilización de los polinucleótidos aislados. Tales microorganismos o bacterias se designan también como microorganismos recombinantes o bacterias recombinantes. De igual manera, son un objeto del invento unos vectores que contienen los polinucleótidos conformes al invento. Finalmente, son asimismo un objeto del invento unos anfitriones que contienen estos vectores.

60 Los polinucleótidos aislados conformes al invento pueden ser utilizados asimismo para conseguir una sobreexpresión de los polipéptidos codificados por ellos.

65 Por el concepto de "sobreexpresión" se entiende por lo general un aumento de la concentración o de la actividad intracelular de un ácido ribonucleico, de una proteína o de una enzima. En el caso del presente invento, se

sobreexpresan unos alelos opcA o respectivamente unos polinucleótidos, que codifican los polipéptidos OpcA conformes al invento.

5 Es conocido que mediante unas enzimas propias del anfitrión - las denominadas aminopeptidasas - se pueden separar aminoácidos N-terminales, en particular la metionina N-terminal, desde el polipéptido formado.

El mencionado aumento de la concentración o de la actividad de un producto génico se puede conseguir, por ejemplo, mediante el recurso de que el número de copias de los correspondientes polinucleótidos se aumenta en por lo menos una copia.

10 Un método ampliamente propagado para el aumento del número de copias consiste en que el correspondiente gen o alelo se incorpora en un vector, de manera preferida un plásmido, que es replicado por una bacteria corineforme. Unos vectores de plásmidos adecuados son por ejemplo el pZ1 (Menkel y colaboradores, Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554) o los vectores pSELF descritos por Tauch y colaboradores (Journal of Biotechnology 99, 79-91 (2002)). Un artículo recopilativo sobre el tema de plásmidos en *Corynebacterium glutamicum* se encuentra en la cita de Tauch y colaboradores (Journal of Biotechnology 104, 27-40 (2003)).

20 Otro método propagado para la consecución de una sobreexpresión es el procedimiento de la amplificación cromosomal de genes. En el caso de este método, por lo menos una copia adicional del gen o alelo interesante se introduce en el cromosoma de una bacteria corineforme.

25 En una forma de realización, tal como se ha descrito por ejemplo en la cita de Reinscheid y colaboradores (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) para el operón hom-thrB, un plásmido, que no se replica en *C. glutamicum*, el cual contiene el gen interesante, se transfiere a una bacteria corineforme. Después de una recombinación homóloga, mediante un suceso de cruzamiento, la cepa resultante contiene por lo menos dos copias del correspondiente gen o respectivamente alelo.

30 En otra forma de realización, que se describe en los documentos WO 03/040373 y de solicitud de patente de los EE.UU. US-2003-0219881-A1, una o varias copia(s) del gen interesante se introduce(n) mediante por lo menos dos sucesos de cruzamiento en un sitio deseado del cromosoma de *C. glutamicum*. De esta manera se incorporó, por ejemplo, una copia de un alelo lysC, que codifica una aspartato cinasa insensible para L-lisina, en el gen gluB de *C. glutamicum*.

35 En otra forma de realización, que se describe en los documentos WO 03/014330 y US-2004-0043458-A1, mediante por lo menos dos sucesos de recombinación se incorpora en el sitio natural por lo menos otra copia más del gen interesante, de manera preferida en una disposición en tandem con respecto al gen o alelo que ya está presente. De esta manera se consiguió por ejemplo una duplicación en tandem de un alelo lysC^{FBR} junto al sitio natural del gen lysC.

40 Otro método para la consecución de una sobreexpresión consiste en unir el correspondiente gen o respectivamente alelo de un modo funcional (en inglés "operably linked") con un promotor o respectivamente una casete de expresión. Unos promotores adecuados para *Corynebacterium glutamicum* se describen, a modo de ejemplo, en el artículo recopilativo de Patek y colaboradores (Journal of Biotechnology 104(1-3), 311-323 (2003)). Además, se pueden utilizar los promotores T3, T7, SP6, M13, lac, tac y trc, que son suficientemente conocidos, y que han sido descritos en las citas de Amann y colaboradores (Gene 69(2), 301-315 (1988)) y Amann y Brosius (Gene 40(2-3), 183-190 (1985)). Un tal promotor puede ser introducido, por ejemplo, corriente arriba de la región codificadora de un alelo opcA conforme al invento, típicamente a una distancia de aproximadamente 1 - 500 o 1 - 334 nucleótidos desde el codón de inicio, de una bacteria corineforme recombinante. Un tal promotor se puede introducir naturalmente asimismo corriente arriba del alelo opcA de un mutante conforme al invento. Además, es posible unir un polinucleótido aislado conforme al invento, que codifica una variante conforme al invento del polipéptido OpcA, con un promotor, e incorporar la unidad de expresión obtenida en un plásmido, que se replica extracromosomalmente, o en el cromosoma de una bacteria corineforme.

55 Además de esto, se pueden mutar las regiones de promotor y regulación, o el sitio de fijación a ribosomas, que se encuentra corriente arriba del gen estructural. Por medio de unas medidas para la prolongación de la duración de vida del ARNm (ARN mensajero) se mejora asimismo la expresión. Además, mediante evitación de la degradación de la proteína enzimática se puede reforzar asimismo la actividad enzimática. Alternativamente, se puede conseguir además una sobreexpresión del correspondiente gen o alelo mediante una modificación de la composición del medio y mediante la realización del cultivo.

60 Mediante las medidas de sobreexpresión se aumenta la actividad o concentración de la correspondiente proteína por lo general por lo menos en un 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 % o 500 %, como máximo hasta un 1.000 % o 2.000 %, referido a la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo de partida o respectivamente en la cepa parental. Por el concepto de "un microorganismo de partida" o de "una cepa parental" se entiende un microorganismo, en el que se llevan a cabo las medidas del invento.

65

La concentración de la proteína se puede determinar en el gel por medio de una separación de proteínas en un gel uni- o bidimensional (de 1 y 2 dimensiones) y de una subsiguiente identificación óptica de la concentración de proteínas con un correspondiente software de evaluación. Un método habitual para la preparación de los geles para proteínas en el caso de bacterias corineformes y para la identificación de las proteínas lo constituye el modo de proceder descrito por Hermann y colaboradores (Electrophoresis, 22:1712-23 (2001)). La concentración de las proteínas se puede determinar asimismo mediante una hibridación por transferencia de bórón Western con un anticuerpo que es específico para la proteína que debe de ser detectada (Sambrook y colaboradores, Molecular cloning: a laboratory manual. 2ª edición Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989) y una subsiguiente evaluación óptica con un correspondiente software para la determinación de la concentración (Lohaus y Meyer (1998) Biospektrum 5:32-39; Lottspeich, Angewandte Chemie 321: 2.630-2.647 (1999)).

De modo correspondiente, son objeto del invento unos procedimientos para la sobreexpresión de los polipéptidos OpcA conformes al invento. Un procedimiento conforme al invento para la sobreexpresión consiste, entre otras cosas, en que se aumenta el número de copias de un polinucleótido conforme al invento, que codifica una variante del polipéptido OpcA conforme al invento, en por lo menos una (1) o varias copias. Otro procedimiento conforme al invento consiste en que se une un promotor funcional con un polinucleótido.

Son objeto del invento además unos microorganismos que tienen en el interior de sus células una concentración aumentada de un polipéptido OpcA conforme al invento. Eventualmente, estos microorganismos poseen una actividad aumentada de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en el interior de sus células.

Adicionalmente, para realizar la producción mejorada de L-aminoácidos puede ser ventajoso sobreexpresar en los mutantes o en las cepas recombinantes conformes al invento una o varias enzimas de la respectiva ruta de biosíntesis, de la glicolisis, de las reacciones anapleróticas, del ciclo del ácido cítrico, del ciclo del fosfato de pentosa, de la exportación de aminoácidos, y eventualmente unas proteínas reguladoras. La utilización de genes endógenos es preferida por lo general.

Por el concepto de "genes endógenos" o de "secuencias endógenas de nucleótidos" se entienden los genes o respectivamente las secuencias de nucleótidos o alelos, que están presentes en la población de una especie.

Así, para la producción de L-lisina se puede(n) sobreexpresar uno o varios de los genes, que se escogen entre el conjunto que se compone de

- un gen *dapA*, que codifica la dihidrodipicolinato sintasa, tal como por ejemplo el gen *dpaA* de tipo silvestre de *Corynebacterium glutamicum*, que se ha descrito en el documento EP 0 197 335,
- un gen *zwf*, que codifica una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, tal como por ejemplo el gen *zwf* de tipo silvestre de *Corynebacterium glutamicum*, que se ha descrito en los documentos de solicitud de patente japonesa JP-A-09224661 y de solicitud de patente europea EP-A-1108790,
- el alelo *zwf* de *Corynebacterium glutamicum*, que se ha descrito en el documento US-2003-0175911-A1, que codifica una proteína, en la que, por ejemplo, la L-alanina en la posición 243 de la secuencia de aminoácidos ha sido reemplazada por L-treonina, o en la que el ácido L-aspártico ha sido reemplazado en la posición 245 por L-serina,
- un gen *pyc*, que codifica una piruvato carboxilasa, tal como, por ejemplo, el gen *pyc* del tipo silvestre de *Corynebacterium glutamicum*, que se describe en los documentos de solicitud de patente alemana DE-A-198 31609 y EP 1108790,
- el alelo *pyc* de *Corynebacterium glutamicum*, que se ha descrito en el documento EP 1 108 790, que codifica una proteína, en la que la L-prolina en la posición 458 de la secuencia de aminoácidos ha sido reemplazada por L-serina,
- el alelo *pyc* de *Corynebacterium glutamicum*, que se describe en el documento WO 02/31158, que codifica unas proteínas, que llevan de acuerdo con la reivindicación 1 uno o varios de los intercambios de aminoácidos, escogidos entre el conjunto que se compone de ácido L-glutámico en la posición 153 reemplazado por ácido L-aspártico, L-alanina en la posición 182 reemplazada por L-serina, L-alanina en la posición 206 reemplazada por L-serina, L-histidina en la posición 227 reemplazada por L-arginina, L-alanina en la posición 452 reemplazada por glicina y ácido L-aspártico en la posición 1.120 reemplazado por ácido L-glutámico (la Figura 2A del documento WO 02/31158 indica dos diferentes posiciones de partida para la piruvato carboxilasa, que se diferencian en una longitud correspondiente a 17 aminoácidos. De modo correspondiente, la posición 153 de acuerdo con la reivindicación 1 del documento WO 02/31158 corresponde a la posición 170 de la Fig. 2A del documento 02/31158, la posición 182 de acuerdo con la reivindicación 1 corresponde a la posición 199 de la Fig. 2A, la posición 206 de acuerdo con la reivindicación 1 corresponde a la posición 223 de la Fig. 2A, la posición 227 de acuerdo con la

reivindicación 1 corresponde a la posición 244 de la Fig. 2A, la posición 452 de acuerdo con la reivindicación 1 corresponde a la posición 469 de la Fig. 2A, la posición 1.120 de acuerdo con la reivindicación 1 corresponde a la posición 1.137 de la Fig. 2B. En la Figura 2A del documento WO 02/31158 se indica además un intercambio de aminoácidos de A (alanina) por G (glicina) en la posición 472. La posición 472 de la proteína con la secuencia MTA en el extremo terminal de N corresponde a la posición 455 de la proteína con la secuencia MST en el extremo terminal de N de acuerdo con la Fig. 2A. En la Fig. 2B del documento WO 02/31158 se indica además un intercambio de aminoácidos de D (ácido aspártico) por E (ácido glutámico) en la posición 1.133 de la proteína con la MTA en el extremo terminal de N),

- un gen *lysC* que codifica una aspartato cinasa, tal como por ejemplo el gen *lysC* de tipo silvestre de *Corynebacterium glutamicum*, que se ha descrito como la SEQ ID NO: 281 en el documento EP-A-1108790 (véanse también los números de acceso AX120085 y 120365) y el que se ha descrito como la SEQ ID NO: 25 en el documento WO 01/00843 (véase el número de acceso AX063743),
- un alelo *lysC*^{FBR} que codifica una variante de la aspartato cinasa resistente a la retroalimentación, en particular correspondiente a la Tabla 1,
- un gen *lysE* que codifica una proteína exportadora de lisina, tal como por ejemplo el gen *lysE* del tipo silvestre de *Corynebacterium glutamicum*, que se ha descrito en el documento DE-A-195 48 222,
- el gen *zwa1* del tipo silvestre de *Corynebacterium glutamicum* que codifica la proteína Zwa1 (documento US 6.632.644).

Además, para la producción de L-lisina puede ser ventajoso, junto a la utilización de los alelos del gen *opcA* conformes al invento, debilitar o desconectar simultáneamente uno o varios genes endógenos, que se escogen entre el conjunto que se compone de

- un gen *pgi*, que codifica una glucosa-6-fosfato isomerasa, tal como, por ejemplo, el gen *pgi* de *Corynebacterium glutamicum*, que se ha descrito en los documentos US 6.586.214 y US 6.465.238,
- un gen *hom*, que codifica una homoserina deshidrogenasa, tal como, por ejemplo, el gen *hom* de *Corynebacterium glutamicum*, que se ha descrito en el documento EP-A-0131171,
- un gen *thrB*, que codifica la homoserina cinasa, tal como, por ejemplo, el gen *thrB* de *Corynebacterium glutamicum*, que se ha descrito por Peoples y colaboradores (*Molecular Microbiology* 2 (1988): 63 - 72)) y
- un gen *pfkB*, que codifica la fosfofructocinasa, tal como, por ejemplo, el gen *pfkB* de *Corynebacterium glutamicum* descrito en el documento WO 01/00844 (secuencia n° 57).

El concepto de "debilitamiento" describe en este contexto la disminución o desconexión de la actividad intracelular de una o varias enzima(s) (proteína(s)) en un microorganismo, que es (son) codificada(s) por el correspondiente ADN, mediante el recurso de que, por ejemplo, se utiliza un promotor débil o se utiliza un gen o respectivamente alelo, que codifica una correspondiente enzima con una baja actividad o respectivamente se desactiva el correspondiente gen o la correspondiente enzima (proteína) y eventualmente se combinan estas medidas.

Mediante las medidas del debilitamiento se reduce la actividad o concentración de la correspondiente proteína por lo general en un 0 hasta 75 %, un 0 hasta 50 %, un 0 hasta 25 %, un 0 hasta 10 % o un 0 hasta 5 % de la actividad o concentración de la proteína de tipo silvestre, o respectivamente de la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo de partida.

Como mutaciones para la producción de un debilitamiento entran en consideración transiciones, transversiones, inserciones y supresiones de por lo menos un (1) par de bases o respectivamente nucleótido. En dependencia del efecto del intercambio de aminoácidos, provocado por la mutación, sobre la actividad enzimática, se habla de mutaciones en un sentido erróneo (en inglés "missense mutations") o de mutaciones sin sentido (en inglés "nonsense mutations"). La mutación en un sentido erróneo conduce a un intercambio de un aminoácido dado en una proteína por otro distinto, tratándose en particular de un intercambio no conservativo de aminoácidos. De esta manera, se perjudica la capacidad de funcionar o respectivamente la actividad de la proteína y se reduce a un valor de 0 a 75 %, de 0 a 50 %, de 0 a 25 %, de 0 a 10 % o de 0 a 5 %. La mutación sin sentido da lugar a un codón de interrupción en la región codificadora del gen, y, por consiguiente, a una interrupción prematura de la traducción. Las inserciones o supresiones de por lo menos un par de bases en un gen dan lugar a unas mutaciones por desplazamiento del marco de lectura (en inglés "frame shift mutations"), que dan lugar a que sean incorporados unos aminoácidos erróneos, o a que la traducción se interrumpa prematuramente. Si como consecuencia de la mutación resulta un codón de interrupción en la región codificadora, entonces esto da lugar asimismo a una interrupción prematura de la traducción.

Las instrucciones para la producción de tales mutaciones pertenecen al estado de la técnica y se pueden deducir de los libros de texto conocidos de genética y biología molecular tales como por ejemplo el libro de texto de Knippers ("Molekulare Genetik" (Genética molecular), 6ª edición, editorial Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Alemania, 1995), del de Winnacker ("Gene und Klone" (Genes y clones), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1990) o del de Hagemann ("Allgemeine Genetik" (Genética general), editorial Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986). Otras medidas adicionales se describen en el estado de la técnica.

Las bacterias corineformes aisladas, que se obtienen por medio de estas medidas, muestran una segregación aumentada en comparación con la cepa de partida empleada o respectivamente con la cepa parental, de la producción del aminoácido deseado en un proceso de fermentación.

Por el concepto de "bacterias aisladas" se han de entender los mutantes y las bacterias recombinantes aislados/as o respectivamente producidos/as conformes al invento, que contienen un alelo *opcA*, que codifica un polipéptido *OpcA* conforme al invento.

El rendimiento de las bacterias aisladas o respectivamente del proceso de fermentación mediando utilización de las mismas en lo que respecta a uno o varios de los parámetros escogidos entre el conjunto que se compone de la concentración del producto (producto por volumen), del rendimiento del producto (producto formado por fuente de carbono consumida) y la formación del producto (producto formado por volumen y tiempo) o también de otros parámetros del proceso y combinaciones de éstos, es mejorado en por lo menos un 0,5 %, por lo menos un 1 %, por lo menos un 1,5 % o por lo menos un 2 %, referido a la cepa de partida o respectivamente a la cepa parental o respectivamente al proceso de fermentación mediando utilización de las mismas.

Las bacterias corineformes aisladas, conformes al invento, se pueden cultivar continuamente - tal como se ha descrito por ejemplo en el documento PCT/EP2004/008882 - o discontinuamente en el procedimiento batch (cultivación por tandas) o en el procedimiento fed batch (procedimiento de afluencia) o en el procedimiento fed batch repeated (procedimiento de afluencia repetida) con el fin de efectuar la producción de L-aminoácidos. Una recopilación acerca de métodos conocidos de cultivación se describe en el libro de texto de Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik [Técnica de bioprocesos 1. Introducción en la técnica de los bioprocesos] (editorial Gustav Fischer, Stuttgart, 1991)) o en el libro de texto de Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen [Biorreactores y disposiciones periféricas] (editorial Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)).

El medio de cultivo que se ha de utilizar, debe de satisfacer de una manera apropiada las exigencias de las respectivas cepas. Unas descripciones de medios de cultivo de diferentes microorganismos están contenidas en el manual "Manual of Methods for General Bacteriology" [Manual de métodos para la bacteriología general] de la American Society for Bacteriology (Washington D.C., EE.UU., 1981). Los conceptos de medio de cultivo y de medio de fermentación o respectivamente de medio se pueden intercambiar recíprocamente.

Como fuente de carbono se pueden utilizar azúcares e hidratos de carbono, tales como p.ej. glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melazas, soluciones que contienen sacarosa procedentes de la producción de remolacha azucarera o de caña de azúcar, almidones, materiales hidrolizados de almidones y celulosas, aceites y grasas, tales como por ejemplo aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y grasa de coco, ácidos grasos, tales como por ejemplo ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes, tales como por ejemplo glicerol, metanol y etanol, y ácidos orgánicos, tales como por ejemplo ácido acético. Estas sustancias se pueden utilizar individualmente o como una mezcla.

Como fuente de nitrógeno se pueden utilizar compuestos orgánicos que contienen nitrógeno, tales como peptonas, un extracto de levadura, un extracto de carne, un extracto de malta, agua de maceración de maíz, harina 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 utilizar individualmente o como una mezcla.

Como fuente de fósforo se pueden utilizar ácido fosfórico, dihidrógeno-fosfato de potasio o hidrógeno-fosfato de dipotasio o bien las correspondientes sales que contienen sodio.

El medio de cultivo debe de contener además unas sales, por ejemplo en forma de cloruros o sulfatos de metales, tales como por ejemplo sodio, potasio, magnesio, calcio y hierro, tales como por ejemplo sulfato de magnesio o sulfato de hierro, que son necesarias para el crecimiento. Finalmente, de manera adicional a las sustancias arriba mencionadas se pueden emplear unas sustancias esenciales para el crecimiento, tales como aminoácidos, por ejemplo, homoserina, y vitaminas, por ejemplo, tiamina, biotina o ácido pantoténico. Al medio de cultivo se le pueden añadir adicionalmente unos adecuados compuestos precursores del respectivo aminoácido.

Las mencionadas sustancias empleadas de partida se pueden añadir al cultivo en forma de una tanda única o se pueden alimentar de una manera apropiada durante la cultivación.

Para realizar el control del pH del cultivo se emplean de un modo apropiado compuestos de carácter básico, tales

como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco o respectivamente agua amoniacal, o compuestos de carácter ácido, tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. El pH se ajusta por lo general a un valor de 6,0 hasta 9,0, de manera preferida de 6,5 hasta 8. Para la represión del desarrollo de espuma se pueden emplear agentes antiespumantes, tales como por ejemplo ésteres poliglicólicos de ácidos grasos. Para la conservación de la estabilidad de los plásmidos, se pueden añadir al medio unas apropiadas sustancias que actúan de un modo selectivo, por ejemplo antibióticos. Con el fin de mantener unas condiciones aerobias, se introducen en el cultivo oxígeno o mezclas gaseosas que contienen oxígeno, tales como por ejemplo aire. La utilización de unos líquidos, que están enriquecidos con peróxido de hidrógeno, es asimismo posible. Eventualmente, la fermentación se realiza a sobrepresión, por ejemplo a una presión de 0,03 a 0,2 MPa. La temperatura del cultivo está situada normalmente en 20°C hasta 45°C y de manera preferida en 25°C hasta 40°C. En el caso del procedimiento batch, la cultivación se prosigue durante tanto tiempo hasta que se haya formado una cantidad máxima de los aminoácidos deseados. Esta meta se alcanza normalmente en el transcurso de 10 horas hasta 160 horas. En el caso de los procedimientos continuos son posibles unos períodos de tiempo de cultivación más largos.

Unos adecuados medios de fermentación se describen, entre otros, en los documentos US 6.221.636, US 5.840.551, US 5.770.409, US 5.605.818, US 5.275.940 y US 4.224.409.

Unos métodos para la determinación de L-aminoácidos se conocen a partir del estado de la técnica. El análisis se puede efectuar, por ejemplo, tal como se ha descrito en la cita de Spackman y colaboradores (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) mediante una cromatografía con intercambio de aniones con una subsiguiente derivatización con ninhidrina, o se puede efectuar mediante una HPLC (cromatografía de fase líquida de alto rendimiento) de fase inversa (en inglés "reversed phase HPLC") tal como se ha descrito en la cita de Lindroth y colaboradores (Analytical Chemistry (1979) 51: 1.167-1.174).

Un objeto del invento es de modo correspondiente un procedimiento para la producción de un L-aminoácido en el que

- a) se fermenta una bacteria corineforme aislada en un medio adecuado, conteniendo la bacteria un gen que codifica un polipéptido OpcA conforme al invento, y
- b) se enriquece el L-aminoácido en el caldo de fermentación o en las células de la bacteria corineforme aislada.

El caldo de fermentación producido de esta manera se recoge a continuación y de manera preferida se transforma ulteriormente para dar un producto sólido o líquido.

Por el concepto de "un caldo de fermentación" se entiende un medio de fermentación, en el que se había cultivado un microorganismo durante un determinado período de tiempo y a una cierta temperatura. El medio de fermentación o respectivamente los medios empleados durante la fermentación contiene/contienen todas las sustancias o respectivamente los componentes, que aseguran una multiplicación del microorganismo y una formación del aminoácido deseado.

Al finalizar la fermentación, el caldo de fermentación resultante contiene de modo correspondiente: a) la biomasa del microorganismo, que ha resultado como consecuencia de la multiplicación (reproducción) de las células del microorganismo, b) el aminoácido deseado, que se ha formado en el transcurso de la fermentación, c) los productos secundarios orgánicos, que se han formado en el transcurso de la fermentación, y d) los componentes, que no se han consumido por la fermentación, del medio de fermentación/de los medios de fermentación empleado/empleados o respectivamente de las sustancias empleadas, tales como, por ejemplo, vitaminas tales como biotina, aminoácidos tales como homoserina, o sales tales como sulfato de magnesio.

A los productos secundarios orgánicos pertenecen unas sustancias, que son producidas por los microorganismos empleados al realizar la fermentación del respectivo L-aminoácido deseado y que son segregadas eventualmente. Entre éstos se cuentan L-aminoácidos, que en comparación con el aminoácido deseado constituyen menos que un 30 %, 20 % o 10 %. A éstos pertenecen además ácidos orgánicos, que llevan de uno a tres grupos carboxilo, tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico, ácido málico o ácido fumárico. Finalmente, a éstos pertenecen también azúcares tales como, por ejemplo, trehalosa.

Unos típicos caldos de fermentación, que son adecuados para finalidades industriales, tienen un contenido de aminoácidos de 40 g/kg a 180 g/kg o de 50 g/kg a 150 g/kg. El contenido de biomasa (como biomasa secada) es por lo general de 20 a 50 g/kg.

En el caso del aminoácido L-lisina, dentro del estado de la técnica se conocen esencialmente cuatro diferentes formas de productos.

Un conjunto de productos que contienen L-lisina, abarca unas soluciones concentradas, acuosas, de carácter alcalino, de L-lisina purificada (documento de patente europea EP-B-0534865). Otro conjunto, tal como el que se

describe por ejemplo en los documentos US 6.340.486 y US 6.465.025, abarca unos concentrados acuosos, de carácter ácido, que contienen una biomasa, de caldos de fermentación que contienen L-lisina. El conjunto más conocido de productos sólidos abarca unas formas pulverulentas o cristalinas de L-lisina purificada o respectivamente pura, que se presenta típicamente en forma de una sal tal como, por ejemplo, el monohidrocloreto de L-lisina. Otro conjunto de formas sólidas de productos se describe, por ejemplo, en el documento EP-B-0533039. La forma de producto allí descrita contiene, junto a L-lisina, la mayor parte de las sustancias empleadas, que se han utilizado durante la producción fermentativa y que no se han consumido, y eventualmente la biomasa del microorganismo empleado con una proporción de > 0 % - 100 %.

Correspondientemente a las diferentes formas de productos, se conocen los más diversos procedimientos, en los cuales el L-aminoácido se recoge a partir del caldo de fermentación, se aísla o purifica, con el fin de producir el producto que contiene el L-aminoácido, o el L-aminoácido purificado.

Para la producción de L-aminoácidos puros, sólidos, se aplican en lo esencial los métodos de la cromatografía con intercambio de iones eventualmente mediando utilización de carbón activado y los métodos de cristalización. En el caso de la lisina se obtiene de esta manera la correspondiente base o una correspondiente sal, tal como, por ejemplo, el monohidrocloreto de lisina (Lys-HCl) o el sulfato de lisina (Lys₂-H₂SO₄).

En el caso de la lisina, en el documento EP-B-0534865 se describe un procedimiento para la producción de soluciones acuosas, de carácter básico, que contienen L-lisina, a partir de caldos de fermentación. En el caso de los procedimientos allí descritos, la biomasa procedente del caldo de fermentación se separa y desecha. Mediante una base tal como, por ejemplo, hidróxido de sodio, potasio o amonio, se ajusta un valor del pH comprendido entre 9 y 11. Los componentes minerales (sales inorgánicas) se separan, después de haber concentrado y enfriado, mediante cristalización a partir del caldo, y, o bien se utilizan como un abono fertilizante o se desechan.

En el caso de los procedimientos para la producción de lisina mediando utilización de las bacterias conformes al invento, se prefieren aquellos procedimientos, en los que se obtienen unos productos que contienen componentes del caldo de fermentación. Éstos se utilizan en particular como aditivos para piensos de animales.

Según sean los requisitos, la biomasa se puede eliminar total o parcialmente a partir del caldo de fermentación, mediante ciertos métodos de separación tales como por ejemplo los de la centrifugación, la filtración, la decantación o una combinación de éstos, o se puede dejar completamente en éste. Eventualmente, la biomasa o respectivamente el caldo de fermentación que contiene la biomasa, se desactiva durante una adecuada etapa de procedimiento, por ejemplo, mediante un tratamiento térmico (calentamiento) o mediante adición de un ácido.

Los componentes químicos de la biomasa son, entre otros, la envoltura de las células, por ejemplo, el peptidoglicano y el arabinogalactano, la proteína o respectivamente el polipéptido, por ejemplo el polipéptido de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, lípidos y fosfolípidos y ácidos nucleicos (ADN y ARN), por ejemplo unos polinucleótidos que contienen la mutación conforme al invento. Como consecuencia de las medidas de desactivación y/o de las otras etapas adicionales del procedimiento (por ejemplo, las de acidificación, desecación por atomización, granulación, etc.), los ácidos nucleicos se presentan típicamente en forma de fragmentos con una longitud de, entre otras, ≥40 - 60 pb (acrónimo de "pares de bases"), >60 - 80 pb, >80 - 100 pb, >100 - 200 pb, >200 - 300 pb, >300 - 400 pb, >400 - 500 pb, >500 - 750 pb, >750 - 1.000 pb, >1.000 - 1.250 pb, >1.250 - 1.500 pb, >1.500 - 1.750 pb, >1.750 - 2.000 pb, >2.000 - 2.500 pb, >2.500 - 3.000 pb, >3.000 - 4.000 pb, >4.000 - 5.000 pb.

En un modo de proceder, la biomasa se elimina totalmente o casi totalmente, de tal manera que en el producto producido no permanece nada (0 %) o como máximo un 30 %, como máximo un 20%, como máximo un 10 %, como máximo un 5 %, como máximo un 1 % o como máximo un 0,1 % de la biomasa. En otro modo de proceder, la biomasa no se elimina o se elimina sólo en pequeñas proporciones, de tal manera que la totalidad (el 100 %) o más de un 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 99,9 % de la biomasa permanece en el producto producido. En un procedimiento conforme al invento, se elimina de modo correspondiente la biomasa en unas proporciones de ≥ 0 % hasta ≤ 100 %.

Finalmente, el caldo de fermentación obtenido después de la fermentación, se puede ajustar a un valor ácido del pH, antes o después de la eliminación total o parcial de la biomasa, con un ácido inorgánico tal como, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico, o con un ácido orgánico, tal como, por ejemplo, ácido propiónico (documento de patente británica GB 1.439.728 o documento EP 1 331 220). Asimismo es posible acidificar el caldo de fermentación con la biomasa que está contenida completamente (documentos US 6.340.486 o US 6.465.025). Finalmente, el caldo se puede estabilizar también mediante una adición de bisulfito de sodio (NaHSO₃, documento de patente británica GB 1.439.728) o de otra sal, tal como, por ejemplo, una sal de amonio, de un metal alcalino o de un metal alcalino-térreo del ácido sulfuroso.

Al realizar la separación de la biomasa, se eliminan de manera eventual parcial o totalmente los materiales sólidos orgánicos o inorgánicos que están contenidos en la biomasa. Los productos secundarios orgánicos, que están disueltos en el caldo de fermentación, y los componentes disueltos, que no se han consumido, del medio de fermentación (es decir, las sustancias empleadas) permanecen en el producto por lo menos parcialmente (> 0 %), de

manera preferida por lo menos en un 25 %, de manera especialmente preferida por lo menos en un 50 % y de manera muy especialmente preferida por lo menos en un 75 %. Eventualmente, ellos permanecen en el producto también totalmente (en un 100 %) o casi totalmente, es decir en > 95 % o en > 98 %. En este sentido, el concepto de "base del caldo de fermentación" significa que un producto contiene por lo menos una parte de los componentes del caldo de fermentación.

A continuación, al caldo se le substraen el agua con métodos conocidos, tales como por ejemplo con ayuda de un evaporador rotatorio, un evaporador de capa fina, un evaporador de película descendente, mediante ósmosis inversa o mediante nanofiltración, o respectivamente él es espesado o concentrado. Este caldo de fermentación concentrado se puede elaborar seguidamente mediante métodos de la liofilización, la desecación por atomización, la granulación por atomización o mediante procedimientos de otro tipo, tal como, por ejemplo, en una capa fluidizada circulante, tal como se ha descrito en el documento PCT/EP2004/006655, para dar unos productos capaces de corrimiento, en particular para dar un polvo finamente dividido o de manera preferida un granulado de granos gruesos. Eventualmente, el producto deseado se puede aislar a partir del granulado obtenido mediante tamizado o separación del polvo.

Asimismo, es posible secar el caldo de fermentación directamente, es decir, sin ninguna concentración previa, mediante desecación por atomización o granulación por atomización.

Por el concepto de "capaz de corrimiento" se entienden unos polvos que salen sin obstáculos desde una serie de recipientes de vidrio de salida, que tienen unos orificios de salida de diferentes tamaños, y por lo menos desde el recipiente con el orificio de 5 mm (milímetros) (Klein: Seifen, Öle, Fette, Wachse (Jabones, aceites, grasas, ceras), 94, 12 (1968)).

Por el concepto de "finamente dividido" se entiende un polvo con una proporción predominante (> 50 %) de un tamaño de granos con diámetros de 20 a 200 µm.

Por el concepto de "de granos gruesos" se entiende un producto con una proporción predominante (> 50 %) de un tamaño de granos con diámetros de 200 a 2.000 µm.

La determinación de los tamaños de los granos se puede llevar a cabo con los métodos de la espectrometría por difracción de rayos láser. Los correspondientes métodos se describen en el libro de texto "Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis" [Medición del tamaño de partículas en la práctica de laboratorio] de R. H. Müller y R. Schuhmann, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1996) o en el libro de texto "Introduction to Particle Technology" [Introducción en la tecnología de partículas] de M. Rhodes, editorial Wiley & Sons (1998).

El polvo capaz de corrimiento, finamente dividido, puede ser transformado, a su vez, mediante apropiados procedimientos de compactación o de granulación, en un producto de granos gruesos, bien capaz de corrimiento, almacenable y ampliamente exento de polvo.

El concepto de "exento de polvo" significa, que el producto contiene solamente unas pequeñas proporciones (< 5 %) con unos tamaños de granos con diámetros por debajo de 100 µm.

El concepto de "almacenable", dentro del sentido de este invento, significa que un producto se puede almacenar durante por lo menos un (1) año o más tiempo, de manera preferida por lo menos durante 1,5 años o más tiempo, de manera especialmente preferida durante dos (2) años o más tiempo, en un entorno seco y frío, sin que aparezca una pérdida esencial (< 5 %) del respectivo aminoácido.

Otro objeto del invento es, de modo correspondiente, un procedimiento para la producción de un producto que contiene un L-aminoácido, de manera preferida L-lisina o L-triptófano, de manera preferida un aditivo para piensos de animales, a partir de caldos de fermentación, que está caracterizado por las etapas de

- a) cultivación y fermentación de una bacteria corineforme, que segrega un L-aminoácido, que contiene por lo menos un alelo *opcA*, que codifica un polipéptido *OpcA* conforme al invento, en un medio de fermentación,
- b) eliminación de la biomasa, que se forma durante la fermentación, en una proporción de 0 a 100 % en peso, y
- c) desecación del caldo de fermentación obtenido de acuerdo con a) y/o b), con el fin de obtener el producto en la deseada forma de polvo o granulado,

añadiéndose eventualmente antes de la etapa b) o c) un ácido, que se escoge entre el conjunto que se compone de ácido sulfúrico, ácido fosfórico o ácido clorhídrico.

De manera preferida, a continuación de la etapa a) o b) se elimina agua a partir del caldo de fermentación, que contiene el L-aminoácido (proceso de aumento de concentración).

Al realizar la granulación o compactación es ventajoso el empleo de unas usuales sustancias coadyuvantes orgánicas o inorgánicas, o respectivamente de unos vehículos tales como almidones, gelatinas, derivados de celulosas o sustancias similares, tales como las que encuentran utilización usualmente en la elaboración de alimentos o de piensos como agentes aglutinantes, gelificantes o espesantes, o de otras sustancias tales como por ejemplo ácidos silícicos, silicatos (documento EP0743016A) y estearatos.

Además, es ventajoso proveer de aceites a la superficie de los granulados obtenidos, tal como se ha descrito en el documento WO 04/054381. Como aceites se pueden utilizar aceites minerales, aceites vegetales o mezclas de aceites vegetales. Ejemplos de tales aceites son aceite de soja, aceite de oliva, mezclas de aceite de soja y de lecitina. De igual manera, también se adecuan aceites de siliconas, poli(etilenglicoles) o una hidroxietil-celulosa. Mediante el tratamiento de las superficies con los aceites mencionados, se consigue una resistencia aumentada a la abrasión del producto y una disminución de la proporción de polvo fino. El contenido de aceite en el producto es de 0,02 a 2,0 % en peso, de manera preferida de 0,02 a 1,0 % en peso, y de manera muy especialmente preferida de 0,2 a 1,0 % en peso, referido a la cantidad total del aditivo para piensos.

Se prefieren unos productos con una proporción de ≥ 97 % en peso con un tamaño de granos con unos diámetros de 100 a 1.800 μm o con una proporción de ≥ 95 % en peso con un tamaño de granos con unos diámetros de 300 a 1.800 μm . La proporción de polvo fino, es decir de partículas con un tamaño de granos $< 100 \mu\text{m}$, se sitúa de manera preferida en > 0 a 1 % en peso, - de manera especialmente preferida como máximo en 0,5 % en peso -.

Alternativamente, el producto se puede extender también sobre un material de vehículo orgánico o inorgánico, que es conocido en la elaboración de piensos, tal como, por ejemplo, ácidos silícicos, silicatos, materiales molidos, salvados, harinas, almidones, azúcares u otros, y/o se puede mezclar y estabilizar con usuales agentes espesantes o aglutinantes. Unos correspondientes ejemplos de aplicación y procedimientos se describen en la bibliografía (Die Mühle + Mischfuttertechnik (El molino + la técnica de piensos mixtos) 132 (1995) 49, página 817).

Finalmente, el producto se puede llevar a un estado, en el que él sea estable frente a la digestión por estómagos de animales, en particular por estómagos de ruminantes, también mediante procedimientos de revestimiento (en inglés "coating") con agentes formadores de películas tales como por ejemplo carbonatos metálicos, ácidos silícicos, silicatos, alginatos, estearatos, almidones, gomas y éteres de celulosa, tal como se ha descrito en el documento DE-C-4100920.

Para el ajuste de una concentración deseada de aminoácidos en el producto, según sean los requisitos, el respectivo aminoácido se puede añadir durante el procedimiento en forma de un concentrado o eventualmente de una sustancia ampliamente pura o respectivamente de su sal, en una forma líquida o sólida. Éstos se pueden añadir individualmente o como unas mezclas al caldo de fermentación, o también durante el proceso de desecación o granulación.

En el caso de la lisina, al realizar la producción de unos productos que contienen lisina, la relación de los iones se ajusta de manera preferida de tal modo que la relación de iones, correspondientemente a la siguiente fórmula,

$$2x[\text{SO}_4^{2-}] + [\text{Cl}^-] - [\text{NH}_4^+] - [\text{Na}^+] - [\text{K}^+] - 2x[\text{Mg}^{2+}] - 2x[\text{Ca}^{2+}] / [\text{L-Lys}]$$

resulte ser de 0,68 a 0,95, de manera preferida de 0,68 a 0,90, tal como se ha descrito por Kushiki y colaboradores en el documento US 20030152633.

En el caso de la lisina, el producto sólido constituido sobre la base del caldo de fermentación, producido de esta manera, tiene un contenido de lisina (como la base de lisina) de 10 % en peso a 70 % en peso o de 20 % en peso a 70 % en peso, de manera preferida de 30 % en peso a 70 % en peso y de manera muy especialmente preferida de 40 % en peso a 70 % en peso, referido a la masa seca del producto. Asimismo, son posibles unos contenidos máximos de la base de lisina de 71 % en peso, 72 % en peso o 73 % en peso.

En el caso de un aminoácido eléctricamente neutro tal como el L-triptófano, el producto sólido producido de esta manera, sobre la base del caldo de fermentación, tiene un contenido de aminoácido de por lo menos 5 % en peso, 10 % en peso, 20 % en peso, 30 % en peso, y como máximo de 50 % en peso, 60 % en peso, 70 % en peso, 80 % en peso, 90 % en peso o hasta de 95 % en peso.

El contenido de agua del producto sólido es de hasta 5 % en peso, de manera preferida de hasta 4 % en peso, y de manera especialmente preferida de menos que 3 % en peso.

Un mutante de *Corynebacterium glutamicum* con la denominación DM1797, que contiene el intercambio de aminoácidos lysC T3111 en la aspartato cinasa, fue depositado el 28 de octubre de 2004 en la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Alemania) como DSM 16833.

5 El mutante *Corynebacterium glutamicum* DM1825 conforme al invento, que contiene L-histidina en la posición 107, L-lisina en la posición 219, L-prolina en la posición 233 y L-tirosina en la posición 261 de la secuencia de aminoácidos del polipéptido OpcA, se depositó el 5 de abril de 2005 en la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Alemania) como DSM 17223.

Ejemplo 1

Mutagénesis de la cepa DM1797 que produce L-lisina

10 La cepa *Corynebacterium glutamicum* DM1797 se empleó como cepa de partida para la mutagénesis con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG). La cepa DM1797 es un mutante de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 resistente a la aminoetilcisteína y se ha depositado bajo la denominación DSM16833 en la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Alemania).

15 La cepa DM1797 se cultivó en 10 ml del caldo LB-Bouillon (de Merck, Darmstadt, Alemania), que estaban contenidos en un matraz Erlenmeyer con una capacidad de 100 ml, durante 24 horas, a 33°C y 200 rpm, en un sacudidor rotatorio del tipo Certomat BS-1 (B. Braun Biotech International, Melsungen, Alemania). A continuación, el cultivo se separó por centrifugación, el sedimento se volvió a suspender en 10 ml de una solución al 0,9 % de NaCl, la suspensión obtenida se separó otra vez por centrifugación y el sedimento obtenido se recogió en 10 ml de una
 20 solución al 0,9 % de NaCl. 5 ml de esta suspensión de células se trataron con 400 µg/ml de MNNG durante 15 minutos a 30°C y a 200 rpm en un sacudidor (véase más arriba). A continuación, la tanda de mutagénesis se separó por centrifugación y el sedimento se recogió en 10 ml de tiosulfato de Na al 2 % en un tampón de NaCl al 0,9 % (pH = 6,0). La suspensión de células se diluyó a continuación en las relaciones de 1:1.000, 1:10.000 y 1:100.000 con una solución al 0,9 % de NaCl, y unos partes alícuotas se sembraron en placas sobre un agar de corazón y cerebro (de
 25 Merck, Darmstadt, Alemania). De esta manera se aislaron aproximadamente 2.500 mutantes.

Ejemplo 2

Ensayo de rendimiento de los mutantes de la cepa DM1797

30 Los mutantes obtenidos en el Ejemplo 1 se cultivaron en un medio nutritivo adecuado para la producción de lisina y se determinó el contenido de lisina en el material sobrenadante del cultivo.

35 Para esto, los clones se multiplicaron primeramente sobre placas de agar de corazón y cerebro (de Merck, Darmstadt, Alemania) durante 24 horas a 33°C. Partiendo de estos cultivos en placas de agar, se inoculó en cada caso un cultivo previo (10 ml del medio en un matraz Erlenmeyer con una capacidad de 100 ml). Como medio para el cultivo previo se utilizó el medio MM. El cultivo previo se incubó durante 24 horas a 33°C y 240 rpm en un sacudidor. A partir de este cultivo previo se inoculó un cultivo principal, de tal manera que la DO (densidad óptica) (a 660 nm) inicial del cultivo principal fue de 0,1 DO. Para el cultivo principal se utilizó asimismo el medio MM.

40	Medio MM	
	CSL	5 g/l
	MOPS	20 g/l
	glucosa (autoclavada por separado)	50 g/l
	Sales:	
45	(NH ₄) ₂ SO ₄	25 g/l
	KH ₂ PO ₄	0,1 g/l
	MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1,0 g/l
	CaCl ₂ * 2 H ₂ O	10 mg/l
	FeSO ₄ * 7 H ₂ O	10 mg/l
50	MnSO ₄ * H ₂ O	5,0 mg/l
	biotina (filtrada en condiciones estériles)	0,3 mg/l
	tiamina * HCl (filtrada en condiciones estériles)	0,2 mg/l
	CaCO ₃	25 g/l

55 El CSL (Corn Steep Liquor = líquido de maceración de maíz), el MOPS (ácido morfolinopropanosulfónico) y la solución salina se ajustaron a pH 7 con agua amoniaca y se autoclavaron. A continuación se añadieron las soluciones esterilizadas de substrato y de vitaminas así como el CaCO₃ autoclavado seco.

60 La cultivación se efectuó en volúmenes de 10 ml, que estaban contenidos en matraces Erlenmeyer, con una capacidad de 100 ml, provistos de obstáculos. La temperatura fue de 33°C, el número de revoluciones fue de 250 rpm y la humedad del aire fue de 80 %.

65 Después de 24 horas se determinó la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de medición de 660 nm con el Biomek 1000 (de Beckmann Instruments GmbH, Munich). La cantidad de lisina formada se determinó con un analizador de aminoácidos de la entidad Eppendorf Biotronik (Hamburgo, Alemania) mediante una cromatografía con intercambio de iones y una derivatización posterior en columna con detección por ninhidrina. Un mutante, que se

distinguía por una formación aumentada de lisina, se designó como DM1825.

Tabla 1

Cepa	DO (660)	Lisina-HCl (g/l)
DM1797	12,3	3,5
DM1825	12,2	3,7

5 **Ejemplo 3**

Secuenciación del gen *opcA* del mutante DM1825

A partir del clon DM1825, con ayuda del método de Eikmanns y colaboradores (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) se aisló un ADN cromosomal. Con ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa se amplificó un fragmento de ADN, que lleva el gen *opcA*. Para esto se utilizaron los siguientes oligonucleótidos como cebadores.

opcA-A1 (SEQ ID NO: 11):
5' cacctggcgc aggccataat 3'

opcA-E1 (SEQ ID NO: 12):
5' cgctgtcgcg tactacatca 3'

Los cebadores representados fueron sintetizados por la entidad MWG Biotech (Ebersberg, Alemania). Ellos hacen posible la amplificación de un fragmento de ADN con una longitud de aproximadamente 1,05 kb (kilobases), que lleva el gen *opcA*. El cebador *opcA*-A1 se fija a la región que corresponde a las posiciones 302 hasta 321 de la cadena complementaria a la SEQ ID NO: 3. El cebador *opcA*-E1 se fija a la región que corresponde a las posiciones 1.335 hasta 1.316 de la cadena de acuerdo con la SEQ ID NO: 3.

La reacción de PCR se llevó a cabo con la polimerasa de ADN Phusion High Fidelity (de New England Biolabs, Francfort, Alemania). La tanda de reacción se formuló según los datos del fabricante y contenía, con un volumen total de 50 µl, 10 µl del tampón 5 x Phusion HF suministrado conjuntamente, desoxinucleósido-trifosfatos en una concentración de en cada caso 200 µM, un cebador en una concentración de 0,5 µM, aproximadamente 50 ng de ADN de molde y 2 unidades de la polimerasa Phusion. Mediante adición de H₂O se ajustó el volumen a 50 µl.

La tanda de PCR se sometió en primer lugar a una desnaturalización introductoria a 98°C durante 30 segundos. Después de esto, repitiéndose 35x (veces), siguieron una etapa de desnaturalización a 98°C durante 20 segundos, una etapa para la fijación del cebador al ADN dispuesto previamente a 60°C durante 20 segundos y la etapa de extensión para la prolongación del cebador a 72°C durante 60 segundos. Después de la etapa final de extensión durante 5 minutos a 72°C, la tanda de PCR se sometió a una electroforesis en gel de agarosa (agarosa al 0,8 %). Un fragmento de ADN con una longitud de aproximadamente 1,85 kb se identificó, se aisló a partir del gel y se purificó mediante utilización del estuche QIAquick Gel Extraction Kit de la entidad Qiagen (Hilden, Alemania).

La secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN amplificado o respectivamente del producto de la PCR fue determinada por la entidad Agowa (Berlín, Alemania). La secuencia obtenida de la región codificadora del alelo *opcA* se representa en la SEQ ID NO: 7. La secuencia de aminoácidos de la proteína glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que se establece con ayuda del programa Patentin, se representa en la SEQ ID NO: 8.

La secuencia de nucleótidos de la región codificadora del alelo *opcA* del mutante DM1825 contiene en la posición 319 citosina, en la posición 657 citosina, en la posición 697 timina y en la posición 781 citosina (véase la SEQ ID NO: 5). El gen del tipo silvestre (véase la SEQ ID NO: 1) contiene en la posición 319 timina, en la posición 657 adenina, en la posición 697 citosina y en la posición 781 timina. Estos intercambios de las nucleobases conducen a intercambios de aminoácidos en las posiciones 107, 219, 233 y 261 de la secuencia de aminoácidos resultante (compárense las SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 6). Estas mutaciones se designan a continuación como *opcAY107H*, *opcAK219N*, *opcAP233S* y *opcAY261H*. Además, el alelo *opcA* de DM1825 contiene todavía otros tres intercambios adicionales de nucleótidos en las posiciones 402, 600 y 648 (véase la SEQ ID NO: 7), que no conducen a ningún intercambio de aminoácidos ("mutaciones mudas").

55 **Ejemplo 4**

Construcción del vector de intercambio pk18mobsacB_*opcAaa4ex*

Con ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa se amplificó un fragmento que contiene la región codificadora del alelo *opcA*, que lleva las mutaciones *opcAY107H*, *opcAK219N*, *opcAP233S* y *opcAY261H*. Como molde se utilizó el ADN cromosomal obtenido en el Ejemplo 3. Como cebadores se escogieron los oligonucleótidos *opcA*-A1 (SEQ ID NO: 11) y *opcA*-E1 (SEQ ID NO: 12) empleados en el Ejemplo 3.

La reacción de PCR se llevó a cabo con la polimerasa de ADN Phusion High-Fidelity (de New England Biolabs, Francfort, Alemania). La tanda de reacción tenía la composición arriba mencionada. La PCR se llevó a cabo tal

como se ha descrito más arriba, con una excepción: la etapa de extensión a 72°C, que se repite 35 veces, se llevó a cabo en cada caso solamente durante 30 segundos.

El fragmento de ADN amplificado, con una longitud de aproximadamente 1,05 kb, que lleva la región codificadora del gen *opcA* de DM1825, se ligó con el estuche Zero Blunt® TOPO Kit de la entidad Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, EE.UU.) en el vector pCR®Blunt II-TOPO.

A continuación, la cepa de *E. coli* Top10 (Grant y colaboradores, Proceedings of the National Academy of Sciences EE.UU, 87 (1990) 4645-4649) se transformó con la tanda de ligación según los datos del fabricante del estuche (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). La selección de las células portadoras de plásmidos se efectuó por siembra en placas de la tanda de transformación sobre un agar LB (de Merck, Darmstadt, Alemania), que había sido suplementado con 25 mg/l de kanamicina. El ADN de plásmido fue aislado a partir de un transformante con ayuda del estuche QIAprep Spin Miniprep Kit de la entidad Qiagen (Hilden, Alemania) y fue comprobado por tratamiento una vez con la enzima de restricción BamHI y una vez con la enzima de restricción EcoRI, con una subsiguiente electroforesis en gel de agarosa (al 0,8 %). El plásmido fue designado como pCRII_*opcAaa4ex* y se ha representado en la Figura 1.

El plásmido fue tratado con la endonucleasa de restricción EcoRI y separado por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 %. El fragmento con un tamaño de aproximadamente 1,05 kb, que había sido dissociado y separado de esta manera, se aisló a continuación a partir del gel y se purificó con el estuche QIAquick Gel Extraction Kit de la entidad Qiagen.

El fragmento de ADN purificado de esta manera contiene las mutaciones descritas en el gen *opcA* y posee unos extremos compatibles con EcoRI (fragmento *opcAaa4ex*). A continuación, él fue incorporado en el vector pK18mobsacB movilizable, descrito por Schäfer y colaboradores (Gene 145, 69-73 (1994), con el fin de hacer posible un intercambio de alelos o respectivamente de mutaciones. Para esto, el pK18mobsacB fue digerido con la enzima de restricción EcoRI y los extremos fueron desfosforilados con una fosfatasa alcalina (Alkaline Phosphatase, de Boehringer Mannheim, Alemania). El vector producido de esta manera se mezcló con el fragmento *opcAaa4ex* y la tanda se trató con el estuche Ready-To-Go T4 DNA Ligase Kit (de Amersham-Pharmacia, Freiburg, Alemania).

A continuación, la cepa de *E. coli* S17-1 (Simon y colaboradores, Bio/Technologie 1: 784-791, 1993) se transformó con la tanda de ligación (Hanahan, In. DNA cloning. A practical Approach, tomo 1, IRL-Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989). La selección en cuanto a células portadoras de plásmidos se efectuó por siembra en placas de la tanda de transformación sobre agar LB (Sambrook y colaboradores, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989), que había sido suplementado con 25 mg/l de kanamicina.

El ADN de plásmido fue aislado a partir de un transformante con ayuda del estuche QIAprep Spin Miniprep Kit de la entidad Qiagen (Hilden, Alemania) y fue comprobado mediante disociación por restricción, en cada caso una vez con la enzima BamHI y una vez con la enzima EcoRI, y una subsiguiente electroforesis en gel de agarosa. El plásmido fue denominado pK18mobsacB_*opcAaa4ex* y se ha representado en la Figura 2.

Ejemplo 5

Incorporación de las mutaciones *opcAY107H*, *opcAK219N*, *opcAP233S* y *opcAY261H* en la cepa DM1797

El vector pK18mobsacB_*opcAaa4ex* descrito en el Ejemplo 4 fue transferido por conjugación a la cepa DM1797 de *C. glutamicum* de acuerdo con el protocolo de Schäfer y colaboradores (Journal of Microbiology 172: 1.663-1.666 (1990)). El vector no se puede replicar de manera autónoma en DM1797y sólo permanece conservado en la célula cuando él se presenta integrado en el cromosoma como consecuencia de un suceso de recombinación. La selección de unos transconjugantes, es decir de clones con el pK18mobsacB_*opcAaa4ex* integrado, se efectuó mediante siembra en placas de la tanda de transformación sobre un agar LB, que había sido suplementado con 25 mg/l de kanamicina y 50 mg/l de ácido nalidíxico. Los transconjugantes resistentes frente a kanamicina fueron extendidos como un frote a continuación sobre placas de agar LB suplementadas con kanamicina (25 mg/l), y se incubaron durante 24 horas a 33°C. Para realizar la selección de mutantes, en los que los que, como consecuencia de un segundo suceso de recombinación, había tenido lugar la excisión del plásmido, los clones fueron cultivados durante 30 horas de un modo no selectivo en un medio LB líquido, a continuación fueron extendidos como un frote sobre agar LB, que había sido suplementado con sacarosa al 10 % y fueron incubados durante 24 horas a 33°C.

El plásmido pK18mobsacB_*opcAaa4ex*, al igual que el plásmido de partida pK18mobsacB, junto al gen de resistencia a kanamicina, contiene una copia del gen *sacB* que codifica la levano sucraza de *Bacillus subtilis*. La expresión del gen *sacB*, que es inducible por sacarosa, da lugar a la formación de la levano sucraza, que cataliza la síntesis del producto levano, que es tóxico para *C. glutamicum*. Sobre un agar LB suplementado con sucrosa (= sacarosa) crecen por lo tanto sólo aquellos clones, en los que el pK18mobsacB_*opcAaa4ex* integrado se ha excindido como consecuencia de un segundo suceso de recombinación. En dependencia de la localización del segundo suceso de recombinación en lo que respecta al sitio de la mutación tiene lugar una excisión del intercambio de alelos o respectivamente de la incorporación de la mutación, o la copia original permanece en el cromosoma del anfitrión.

5 A continuación se buscó un clon, en el que se había efectuado el intercambio deseado, es decir la incorporación de las mutaciones *opcAY107H*, *opcAK219N*, *opcAP233S* y *opcAY261H*. Para esto, a partir de 20 clones con el fenotipo "crecimiento en presencia de sacarosa" y "ausencia de crecimiento en presencia de kanamicina", se determinó la secuencia del gen *opcA*. De esta manera se identificó un clon, que lleva las mutaciones *opcAY107H*, *opcAK219N*, *opcAP233S* y *opcAY261H*. Esta cepa fue denominada como *C. glutamicum* DM1797_opcAaa4ex.

Ejemplo 6

10 Comparación del rendimiento de la cepa DM1797_opcAaa4ex con la cepa de partida DM1797.

El ensayo de rendimiento se llevó a cabo tal como se ha descrito en el Ejemplo 2. La cepa DM1797_opcAaa4ex mostró, en comparación con la DM1797, una segregación aumentada de lisina, similar a la de la DM1825 (véase la Tabla 1).

15 Breve descripción de las Figuras:

Figura 1: mapa del plásmido pCRII_opcAaa4ex

Figura 2: mapa del plásmido pK18mobsacB_opcAaa4ex

20 Las abreviaturas y las denominaciones que se utilizan tienen los siguientes significados. En el caso de la indicación del número de pares de bases (pbs) se trata de unos valores aproximados, que se obtienen dentro del marco de la reproducibilidad de las mediciones.

- | | | |
|----|---------------|--|
| 25 | pUC | origen de la replicación pUC |
| | Kan: | gen de resistencia a kanamicina |
| | EcoRI: | sitio de corte de la enzima de restricción EcoRI |
| | BamHI: | sitio de corte de la enzima de restricción BamHI |
| | opcA: | fragmento de ADN clonado, que contiene la región codificadora del alelo <i>opcA</i> del mutante DM1825 |
| | sacB: | gen <i>sacB</i> |
| 30 | RP4-mob: | región mob con el origen de la replicación para la transferencia (<i>oriT</i>) |
| | <i>oriV</i> : | origen de la replicación V |

ES 2 374 837 T3

Protocolo de secuencias:

<110> Degussa AG

5 <120> Alelos del gen opcA de bacterias corineformes

<130> 050109BT

<160> 20

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 960

<212> ADN

15 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (957)

20 <223> gen opcA de tipo silvestre

<400> 1

atg atc ttt gaa ctt ccg gat acc acc acc cag caa att tcc aag acc	48
Met Ile Phe Glu Leu Pro Asp Thr Thr Thr Gln Gln Ile Ser Lys Thr	
1 5 10 15	
cta act cga ctg cgt gaa tcg ggc acc cag gtc acc acc ggc cga gtg	96
Leu Thr Arg Leu Arg Glu Ser Gly Thr Gln Val Thr Thr Gly Arg Val	
20 25 30	
ctc acc ctc atc gtg gtc act gac tcc gaa agc gat gtc gct gca gtt	144
Leu Thr Leu Ile Val Val Thr Asp Ser Glu Ser Asp Val Ala Ala Val	
35 40 45	
acc gag tcc acc aat gaa gcc tcg cgc gag cac cca tct cgc gtg atc	192
Thr Glu Ser Thr Asn Glu Ala Ser Arg Glu His Pro Ser Arg Val Ile	
50 55 60	
att ttg gtg gtt ggc gat aaa act gca gaa aac aaa gtt gac gca gaa	240
Ile Leu Val Val Gly Asp Lys Thr Ala Glu Asn Lys Val Asp Ala Glu	
65 70 75 80	
gtc cgt atc ggt ggc gac gct ggt gct tcc gag atg atc atc atg cat	288
Val Arg Ile Gly Gly Asp Ala Gly Ala Ser Glu Met Ile Ile Met His	
85 90 95	
ctc aac gga cct gtc gct gac aag ctc cag tat gtc gtc aca cca ctg	336
Leu Asn Gly Pro Val Ala Asp Lys Leu Gln Tyr Val Val Thr Pro Leu	
100 105 110	
ttg ctt cct gac acc ccc atc gtt gct tgg tgg cca ggt gaa tca cca	384
Leu Leu Pro Asp Thr Pro Ile Val Ala Trp Trp Pro Gly Glu Ser Pro	
115 120 125	
aag aat cct tcc cag gac cca att gga cgc atc gca caa cga cgc atc	432
Lys Asn Pro Ser Gln Asp Pro Ile Gly Arg Ile Ala Gln Arg Arg Ile	
130 135 140	

ES 2 374 837 T3

act gat gct ttg tac gac cgt gat gac gca cta gaa gat cgt gtt gag 480
 Thr Asp Ala Leu Tyr Asp Arg Asp Asp Ala Leu Glu Asp Arg Val Glu
 145 150 155 160

aac tat cac cca ggt gat acc gac atg acg tgg gcg cgc ctt acc cag 528
 Asn Tyr His Pro Gly Asp Thr Asp Met Thr Trp Ala Arg Leu Thr Gln
 165 170 175

tgg cgg gga ctt gtt gcc tcc tca ttg gat cac cca cca cac agc gaa 576
 Trp Arg Gly Leu Val Ala Ser Ser Leu Asp His Pro Pro His Ser Glu
 180 185 190

atc act tcc gtg agg ctg acc ggt gca agc ggc agt acc tcg gtg gat 624
 Ile Thr Ser Val Arg Leu Thr Gly Ala Ser Gly Ser Thr Ser Val Asp
 195 200 205

ttg gct gca ggc tgg ttg gcg cgg agg ctg aaa gtg cct gtg atc cgc 672
 Leu Ala Ala Gly Trp Leu Ala Arg Arg Leu Lys Val Pro Val Ile Arg
 210 215 220

gag gtg aca gat gct ccc acc gtg cca acc gat gag ttt ggt act cca 720
 Glu Val Thr Asp Ala Pro Thr Val Pro Thr Asp Glu Phe Gly Thr Pro
 225 230 235 240

ctg ctg gct atc cag cgc ctg gag atc gtt cgc acc acc ggc tcg atc 768
 Leu Leu Ala Ile Gln Arg Leu Glu Ile Val Arg Thr Thr Gly Ser Ile
 245 250 255

atc atc acc atc tat gac gct cat acc ctt cag gta gag atg ccg gaa 816
 Ile Ile Thr Ile Tyr Asp Ala His Thr Leu Gln Val Glu Met Pro Glu
 260 265 270

tcc ggc aat gcc cca tcg ctg gtg gct att ggt cgt cga agt gag tcc 864
 Ser Gly Asn Ala Pro Ser Leu Val Ala Ile Gly Arg Arg Ser Glu Ser
 275 280 285

gac tgc ttg tct gag gag ctt cgc cac atg gat cca gat ttg ggc tac 912
 Asp Cys Leu Ser Glu Glu Leu Arg His Met Asp Pro Asp Leu Gly Tyr
 290 295 300

cag cac gca cta tcc ggc ttg tcc agc gtc aag ctg gaa acc gtc taa 960
 Gln His Ala Leu Ser Gly Leu Ser Ser Val Lys Leu Glu Thr Val
 305 310 315

<210> 2
 <211> 319
 <212> PRT
 5 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 2
 Met Ile Phe Glu Leu Pro Asp Thr Thr Thr Gln Gln Ile Ser Lys Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Arg Leu Arg Glu Ser Gly Thr Gln Val Thr Thr Gly Arg Val
 20 25 30
 Leu Thr Leu Ile Val Val Thr Asp Ser Glu Ser Asp Val Ala Ala Val
 35 40 45

ES 2 374 837 T3

Thr Glu Ser Thr Asn Glu Ala Ser Arg Glu His Pro Ser Arg Val Ile
 50 55 60

Ile Leu Val Val Gly Asp Lys Thr Ala Glu Asn Lys Val Asp Ala Glu
 65 70 75 80

Val Arg Ile Gly Gly Asp Ala Gly Ala Ser Glu Met Ile Ile Met His
 85 90 95

Leu Asn Gly Pro Val Ala Asp Lys Leu Gln Tyr Val Val Thr Pro Leu
 100 105 110

Leu Leu Pro Asp Thr Pro Ile Val Ala Trp Trp Pro Gly Glu Ser Pro
 115 120 125

Lys Asn Pro Ser Gln Asp Pro Ile Gly Arg Ile Ala Gln Arg Arg Ile
 130 135 140

Thr Asp Ala Leu Tyr Asp Arg Asp Asp Ala Leu Glu Asp Arg Val Glu
 145 150 155 160

Asn Tyr His Pro Gly Asp Thr Asp Met Thr Trp Ala Arg Leu Thr Gln
 165 170 175

Trp Arg Gly Leu Val Ala Ser Ser Leu Asp His Pro Pro His Ser Glu
 180 185 190

Ile Thr Ser Val Arg Leu Thr Gly Ala Ser Gly Ser Thr Ser Val Asp
 195 200 205

Leu Ala Ala Gly Trp Leu Ala Arg Arg Leu Lys Val Pro Val Ile Arg
 210 215 220

Glu Val Thr Asp Ala Pro Thr Val Pro Thr Asp Glu Phe Gly Thr Pro
 225 230 235 240

Leu Leu Ala Ile Gln Arg Leu Glu Ile Val Arg Thr Thr Gly Ser Ile
 245 250 255

Ile Ile Thr Ile Tyr Asp Ala His Thr Leu Gln Val Glu Met Pro Glu
 260 265 270

Ser Gly Asn Ala Pro Ser Leu Val Ala Ile Gly Arg Arg Ser Glu Ser
 275 280 285

ES 2 374 837 T3

Asp Cys Leu Ser Glu Glu Leu Arg His Met Asp Pro Asp Leu Gly Tyr
 290 295 300

Gln His Ala Leu Ser Gly Leu Ser Ser Val Lys Leu Glu Thr Val
 305 310 315

<210> 3
 <211> 1600
 <212> ADN
 5 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <221> CDS
 <222> (335) .. (1291)
 10 <223> gen opcA de tipo silvestre

<400> 3
 gtgtgctcat ccgcttcggg tccaagggtc caggttctgc catggaagtc cgtgacgtca 60
 acatggactt ctctactca gaatccttca ctgaagaatc acctgaagca tacgagcgcc 120
 tcattttgga tgcgctgtta gatgaatcca gcctcttccc taccaacgag gaagtggaac 180
 tgagctggaa gattctggat ccaattcttg aagcatggga tgccgatgga gaaccagagg 240
 attaccagc gggtagctgg ggtccaaaga gcgctgatga aatgctttcc cgcaacggtc 300
 acacctggcg caggccataa tttaggggca aaaa atg atc ttt gaa ctt ccg gat 355
 Met Ile Phe Glu Leu Pro Asp
 1 5
 acc acc acc cag caa att tcc aag acc cta act cga ctg cgt gaa tcg 403
 Thr Thr Thr Gln Gln Ile Ser Lys Thr Leu Thr Arg Leu Arg Glu Ser
 10 15 20
 ggc acc cag gtc acc acc ggc cga gtg ctc acc ctc atc gtg gtc act 451
 Gly Thr Gln Val Thr Thr Gly Arg Val Leu Thr Leu Ile Val Val Thr
 25 30 35
 gac tcc gaa agc gat gtc gct gca gtt acc gag tcc acc aat gaa gcc 499
 Asp Ser Glu Ser Asp Val Ala Ala Val Thr Glu Ser Thr Asn Glu Ala
 40 45 50 55
 tcg cgc gag cac cca tct cgc gtg atc att ttg gtg gtt ggc gat aaa 547
 Ser Arg Glu His Pro Ser Arg Val Ile Ile Leu Val Val Gly Asp Lys
 60 65 70
 act gca gaa aac aaa gtt gac gca gaa gtc cgt atc ggt ggc gac gct 595
 Thr Ala Glu Asn Lys Val Asp Ala Glu Val Arg Ile Gly Gly Asp Ala
 75 80 85
 ggt gct tcc gag atg atc atc atg cat ctc aac gga cct gtc gct gac 643
 Gly Ala Ser Glu Met Ile Ile Met His Leu Asn Gly Pro Val Ala Asp
 90 95 100
 aag ctc cag tat gtc gtc aca cca ctg ttg ott cct gac acc ccc atc 691
 Lys Leu Gln Tyr Val Val Thr Pro Leu Leu Leu Pro Asp Thr Pro Ile
 105 110 115

ES 2 374 837 T3

gtt gct tgg tgg cca ggt gaa tca cca aag aat cct tcc cag gac cca 739
 Val Ala Trp Trp Pro Gly Glu Ser Pro Lys Asn Pro Ser Gln Asp Pro
 120 125 130 135

att gga cgc atc gca caa cga cgc atc act gat gct ttg tac gac cgt 787
 Ile Gly Arg Ile Ala Gln Arg Arg Ile Thr Asp Ala Leu Tyr Asp Arg
 140 145 150

gat gac gca cta gaa gat cgt gtt gag aac tat cac cca ggt gat acc 835
 Asp Asp Ala Leu Glu Asp Arg Val Glu Asn Tyr His Pro Gly Asp Thr
 155 160 165

gac atg acg tgg gcg cgc ctt acc cag tgg cgg gga ctt gtt gcc tcc 883
 Asp Met Thr Trp Ala Arg Leu Thr Gln Trp Arg Gly Leu Val Ala Ser
 170 175 180

tca ttg gat cac cca cca cac agc gaa atc act tcc gtg agg ctg acc 931
 Ser Leu Asp His Pro Pro His Ser Glu Ile Thr Ser Val Arg Leu Thr
 185 190 195

ggt gca agc ggc agt acc tcg gtg gat ttg gct gca ggc tgg ttg gcg 979
 Gly Ala Ser Gly Ser Thr Ser Val Asp Leu Ala Ala Gly Trp Leu Ala
 200 205 210 215

cgg agg ctg aaa gtg cct gtg atc cgc gag gtg aca gat gct ccc acc 1027
 Arg Arg Leu Lys Val Pro Val Ile Arg Glu Val Thr Asp Ala Pro Thr
 220 225 230

gtg cca acc gat gag ttt ggt act cca ctg ctg gct atc cag cgc ctg 1075
 Val Pro Thr Asp Glu Phe Gly Thr Pro Leu Leu Ala Ile Gln Arg Leu
 235 240 245

gag atc gtt cgc acc acc ggc tcg atc atc atc acc atc tat gac gct 1123
 Glu Ile Val Arg Thr Thr Gly Ser Ile Ile Ile Thr Ile Tyr Asp Ala
 250 255 260

cat acc ctt cag gta gag atg ccg gaa tcc ggc aat gcc cca tcg ctg 1171
 His Thr Leu Gln Val Glu Met Pro Glu Ser Gly Asn Ala Pro Ser Leu
 265 270 275

gtg gct att ggt cgt cga agt gag tcc gac tgc ttg tct gag gag ctt 1219
 Val Ala Ile Gly Arg Arg Ser Glu Ser Asp Cys Leu Ser Glu Glu Leu
 280 285 290 295

cgc cac atg gat cca gat ttg ggc tac cag cac gca cta tcc ggc ttg 1267
 Arg His Met Asp Pro Asp Leu Gly Tyr Gln His Ala Leu Ser Gly Leu
 300 305 310

tcc agc gtc aag ctg gaa acc gtc taaggagaaa tacaacacta tggttgatgt 1321
 Ser Ser Val Lys Leu Glu Thr Val
 315

agtacgcgca cgcgatactg aagatttggt tgcacaggct gcctccaaat tcattgaggt 1381

tgttgaagca gcaactgccataaatggcac cgcacaggta gtgctcaccg gtggtggcgc 1441

cggcatcaag ttgctggaaa agctcagcgt tgatggggct gaccttgccct gggatcgcac 1501

tcatgtgttc ttoggcgatg agcgcgatgt ccctgtcagt gattctgagt ccaatgaggg 1561

ccaggctcgt gaggcactgt tgtccaaggt ttctatccc 1600

ES 2 374 837 T3

<210> 4
 <211> 319
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

5

<400> 4

```

Met Ile Phe Glu Leu Pro Asp Thr Thr Thr Gln Gln Ile Ser Lys Thr
 1           5                10                15

Leu Thr Arg Leu Arg Glu Ser Gly Thr Gln Val Thr Thr Gly Arg Val
      20                25                30

Leu Thr Leu Ile Val Val Thr Asp Ser Glu Ser Asp Val Ala Ala Val
      35                40                45

Thr Glu Ser Thr Asn Glu Ala Ser Arg Glu His Pro Ser Arg Val Ile
      50                55                60

Ile Leu Val Val Gly Asp Lys Thr Ala Glu Asn Lys Val Asp Ala Glu
65                70                75                80

Val Arg Ile Gly Gly Asp Ala Gly Ala Ser Glu Met Ile Ile Met His
      85                90                95

Leu Asn Gly Pro Val Ala Asp Lys Leu Gln Tyr Val Val Thr Pro Leu
      100                105                110

Leu Leu Pro Asp Thr Pro Ile Val Ala Trp Trp Pro Gly Glu Ser Pro
      115                120                125

Lys Asn Pro Ser Gln Asp Pro Ile Gly Arg Ile Ala Gln Arg Arg Ile
      130                135                140

Thr Asp Ala Leu Tyr Asp Arg Asp Asp Ala Leu Glu Asp Arg Val Glu
145                150                155                160

Asn Tyr His Pro Gly Asp Thr Asp Met Thr Trp Ala Arg Leu Thr Gln
      165                170                175

Trp Arg Gly Leu Val Ala Ser Ser Leu Asp His Pro Pro His Ser Glu
      180                185                190

Ile Thr Ser Val Arg Leu Thr Gly Ala Ser Gly Ser Thr Ser Val Asp
      195                200                205

Leu Ala Ala Gly Trp Leu Ala Arg Arg Leu Lys Val Pro Val Ile Arg
210                215                220
    
```

ES 2 374 837 T3

Glu Val Thr Asp Ala Pro Thr Val Pro Thr Asp Glu Phe Gly Thr Pro
 225 230 235 240

Leu Leu Ala Ile Gln Arg Leu Glu Ile Val Arg Thr Thr Gly Ser Ile
 245 250 255

Ile Ile Thr Ile Tyr Asp Ala His Thr Leu Gln Val Glu Met Pro Glu
 260 265 270

Ser Gly Asn Ala Pro Ser Leu Val Ala Ile Gly Arg Arg Ser Glu Ser
 275 280 285

Asp Cys Leu Ser Glu Glu Leu Arg His Met Asp Pro Asp Leu Gly Tyr
 290 295 300

Gln His Ala Leu Ser Gly Leu Ser Ser Val Lys Leu Glu Thr Val
 305 310 315

<210> 5
 <211> 960
 <212> ADN
 5 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (957)
 10 <223> alelo opcA

<220>
 <221> mutación
 <222> (319) .. (319)
 15 <223> transición T -> C

<220>
 <221> mutación
 <222> (657) .. (657)
 20 <223> transversión T -> C

<220>
 <221> mutación
 <222> (697) .. (697)
 25 <223> transición C -> T

<220>
 <221> mutación
 <222> (781) .. (781)
 30 <223> transición T -> C

<400> 5
 atg atc ttt gaa ctt ccg gat acc acc acc cag caa att tcc aag acc 48
 Met Ile Phe Glu Leu Pro Asp Thr Thr Thr Gln Gln Ile Ser Lys Thr
 1 5 10 15

ES 2 374 837 T3

cta act cga ctg cgt gaa tcg ggc acc cag gtc acc acc ggc cga gtg Leu Thr Arg Leu Arg Glu Ser Gly Thr Gln Val Thr Thr Gly Arg Val 20 25 30	96
ctc acc ctc atc gtg gtc act gac tcc gaa agc gat gtc gct gca gtt Leu Thr Leu Ile Val Val Thr Asp Ser Glu Ser Asp Val Ala Ala Val 35 40 45	144
acc gag tcc acc aat gaa gcc tcg cgc gag cac cca tct cgc gtg atc Thr Glu Ser Thr Asn Glu Ala Ser Arg Glu His Pro Ser Arg Val Ile 50 55 60	192
att ttg gtg gtt ggc gat aaa act gca gaa aac aaa gtt gac gca gaa Ile Leu Val Val Gly Asp Lys Thr Ala Glu Asn Lys Val Asp Ala Glu 65 70 75 80	240
gtc cgt atc ggt ggc gac gct ggt gct tcc gag atg atc atc atg cat Val Arg Ile Gly Gly Asp Ala Gly Ala Ser Glu Met Ile Ile Met His 85 90 95	288
ctc aac gga cct gtc gct gac aag ctc cag cat gtc gtc aca cca ctg Leu Asn Gly Pro Val Ala Asp Lys Leu Gln His Val Val Thr Pro Leu 100 105 110	336
ttg ctt cct gac acc ccc atc gtt gct tgg tgg cca ggt gaa tca cca Leu Leu Pro Asp Thr Pro Ile Val Ala Trp Trp Pro Gly Glu Ser Pro 115 120 125	384
aag aat cct tcc cag gac cca att gga cgc atc gca caa cga cgc atc Lys Asn Pro Ser Gln Asp Pro Ile Gly Arg Ile Ala Gln Arg Arg Ile 130 135 140	432
act gat gct ttg tac gac cgt gat gac gca cta gaa gat cgt gtt gag Thr Asp Ala Leu Tyr Asp Arg Asp Asp Ala Leu Glu Asp Arg Val Glu 145 150 155 160	480
aac tat cac cca ggt gat acc gac atg acg tgg gcg cgc ctt acc cag Asn Tyr His Pro Gly Asp Thr Asp Met Thr Trp Ala Arg Leu Thr Gln 165 170 175	528
tgg cgg gga ctt gtt gcc tcc tca ttg gat cac cca cca cac agc gaa Trp Arg Gly Leu Val Ala Ser Ser Leu Asp His Pro Pro His Ser Glu 180 185 190	576
atc act tcc gtg agg ctg acc ggt gca agc ggc agt acc tcg gtg gat Ile Thr Ser Val Arg Leu Thr Gly Ala Ser Gly Ser Thr Ser Val Asp 195 200 205	624
ttg gct gca ggc tgg ttg gcg cgg agg ctg aac gtg cct gtg atc cgc Leu Ala Ala Gly Trp Leu Ala Arg Arg Leu Asn Val Pro Val Ile Arg 210 215 220	672
gag gtg aca gat gct ccc acc gtg tca acc gat gag ttt ggt act cca Glu Val Thr Asp Ala Pro Thr Val Ser Thr Asp Glu Phe Gly Thr Pro 225 230 235 240	720
ctg ctg gct atc cag cgc ctg gag atc gtt cgc acc acc ggc tcg atc Leu Leu Ala Ile Gln Arg Leu Glu Ile Val Arg Thr Thr Gly Ser Ile 245 250 255	768

ES 2 374 837 T3

atc atc acc atc cat gac gct cat acc ctt cag gta gag atg ccg gaa 816
Ile Ile Thr Ile His Asp Ala His Thr Leu Gln Val Glu Met Pro Glu
260 265 270

tcc ggc aat gcc cca tcg ctg gtg gct att ggt cgt cga agt gag tcc 864
Ser Gly Asn Ala Pro Ser Leu Val Ala Ile Gly Arg Arg Ser Glu Ser
275 280 285

gac tgc ttg tct gag gag ctt cgc cac atg gat cca gat ttg ggc tac 912
Asp Cys Leu Ser Glu Glu Leu Arg His Met Asp Pro Asp Leu Gly Tyr
290 295 300

cag cac gca cta tcc ggc ttg tcc agc gtc aag ctg gaa acc gtc taa 960
Gln His Ala Leu Ser Gly Leu Ser Ser Val Lys Leu Glu Thr Val
305 310 315

<210> 6
<211> 319
<212> PRT

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 6

Met Ile Phe Glu Leu Pro Asp Thr Thr Thr Gln Gln Ile Ser Lys Thr
1 5 10 15

Leu Thr Arg Leu Arg Glu Ser Gly Thr Gln Val Thr Thr Gly Arg Val
20 25 30

Leu Thr Leu Ile Val Val Thr Asp Ser Glu Ser Asp Val Ala Ala Val
35 40 45

Thr Glu Ser Thr Asn Glu Ala Ser Arg Glu His Pro Ser Arg Val Ile
50 55 60

Ile Leu Val Val Gly Asp Lys Thr Ala Glu Asn Lys Val Asp Ala Glu
65 70 75 80

Val Arg Ile Gly Gly Asp Ala Gly Ala Ser Glu Met Ile Ile Met His
85 90 95

Leu Asn Gly Pro Val Ala Asp Lys Leu Gln His Val Val Thr Pro Leu
100 105 110

Leu Leu Pro Asp Thr Pro Ile Val Ala Trp Trp Pro Gly Glu Ser Pro
115 120 125

Lys Asn Pro Ser Gln Asp Pro Ile Gly Arg Ile Ala Gln Arg Arg Ile
130 135 140

Thr Asp Ala Leu Tyr Asp Arg Asp Asp Ala Leu Glu Asp Arg Val Glu
145 150 155 160

ES 2 374 837 T3

Asn Tyr His Pro Gly Asp Thr Asp Met Thr Trp Ala Arg Leu Thr Gln
 165 170 175

Trp Arg Gly Leu Val Ala Ser Ser Leu Asp His Pro Pro His Ser Glu
 180 185 190

Ile Thr Ser Val Arg Leu Thr Gly Ala Ser Gly Ser Thr Ser Val Asp
 195 200 205

Leu Ala Ala Gly Trp Leu Ala Arg Arg Leu Asn Val Pro Val Ile Arg
 210 215 220

Glu Val Thr Asp Ala Pro Thr Val Ser Thr Asp Glu Phe Gly Thr Pro
 225 230 235 240

Leu Leu Ala Ile Gln Arg Leu Glu Ile Val Arg Thr Thr Gly Ser Ile
 245 250 255

Ile Ile Thr Ile His Asp Ala His Thr Leu Gln Val Glu Met Pro Glu
 260 265 270

Ser Gly Asn Ala Pro Ser Leu Val Ala Ile Gly Arg Arg Ser Glu Ser
 275 280 285

Asp Cys Leu Ser Glu Glu Leu Arg His Met Asp Pro Asp Leu Gly Tyr
 290 295 300

Gln His Ala Leu Ser Gly Leu Ser Ser Val Lys Leu Glu Thr Val
 305 310 315

- <210> 7
- <211> 960
- <212> ADN
- 5 <213> Corynebacterium glutamicum

- <220>
- <221> CDS
- <222> (1) .. (957)
- 10 <223> alelo opcA

- <220>
- <221> mutación
- <222> (319) .. (319)
- 15 <223> transición T -> C

- <220>
- <221> mutación
- <222> (402) .. (402)
- 20 <223> transición C -> T

<220>
 <221> mutación
 <222> (600) .. (600)
 <223> transición T -> C

5

<220>
 <221> mutación
 <222> (648) .. (648)
 <223> transversión G -> C

10

<220>
 <221> mutación
 <222> (657) .. (657)
 <223> transversión A -> C

15

<220>
 <221> mutación
 <222> (697) .. (697)
 <223> transición C -> T

20

<220>
 <221> mutación
 <222> (781) .. (781)
 <223> transición T -> C

25

<400> 7
 atg atc ttt gaa ctt ccg gat acc acc acc cag caa att tcc aag acc 48
 Met Ile Phe Glu Leu Pro Asp Thr Thr Thr Gln Gln Ile Ser Lys Thr
 1 5 10 15

 cta act cga ctg cgt gaa tcg ggc acc cag gtc acc acc ggc cga gtg 96
 Leu Thr Arg Leu Arg Glu Ser Gly Thr Gln Val Thr Thr Gly Arg Val
 20 25 30

 ctc acc ctc atc gtg gtc act gac tcc gaa agc gat gtc gct gca gtt 144
 Leu Thr Leu Ile Val Val Thr Asp Ser Glu Ser Asp Val Ala Ala Val
 35 40 45

 acc gag tcc acc aat gaa gcc tcg cgc gag cac cca tct cgc gtg atc 192
 Thr Glu Ser Thr Asn Glu Ala Ser Arg Glu His Pro Ser Arg Val Ile
 50 55 60

 att ttg gtg gtt ggc gat aaa act gca gaa aac aaa gtt gac gca gaa 240
 Ile Leu Val Val Gly Asp Lys Thr Ala Glu Asn Lys Val Asp Ala Glu
 65 70 75 80

 gtc cgt atc ggt ggc gac gct ggt gct tcc gag atg atc atc atg cat 288
 Val Arg Ile Gly Gly Asp Ala Gly Ala Ser Glu Met Ile Ile Met His
 85 90 95

 ctc aac gga cct gtc gct gac aag ctc cag cat gtc gtc aca cca ctg 336
 Leu Asn Gly Pro Val Ala Asp Lys Leu Gln His Val Val Thr Pro Leu
 100 105 110

 ttg ctt cct gac acc ccc atc gtt gct tgg tgg cca ggt gaa tca cca 384
 Leu Leu Pro Asp Thr Pro Ile Val Ala Trp Trp Pro Gly Glu Ser Pro
 115 120 125

 aag aat cct tcc cag gat cca att gga cgc atc gca caa cga cgc atc 432
 Lys Asn Pro Ser Gln Asp Pro Ile Gly Arg Ile Ala Gln Arg Arg Ile
 130 135 140

ES 2 374 837 T3

act gat gct ttg tac gac cgt gat gac gca cta gaa gat cgt gtt gag 480
 Thr Asp Ala Leu Tyr Asp Arg Asp Asp Ala Leu Glu Asp Arg Val Glu
 145 150 155 160

aac tat cac cca ggt gat acc gac atg acg tgg gcg cgc ctt acc cag 528
 Asn Tyr His Pro Gly Asp Thr Asp Met Thr Trp Ala Arg Leu Thr Gln
 165 170 175

tgg cgg gga ctt gtt gcc tcc tca ttg gat cac cca cca cac agc gaa 576
 Trp Arg Gly Leu Val Ala Ser Ser Leu Asp His Pro Pro His Ser Glu
 180 185 190

atc act tcc gtg agg ctg acc ggc gca agc ggc agt acc tcg gtg gat 624
 Ile Thr Ser Val Arg Leu Thr Gly Ala Ser Gly Ser Thr Ser Val Asp
 195 200 205

ttg gct gca ggc tgg ttg gcg cgc agg ctg aac gtg cct gtg atc cgc 672
 Leu Ala Ala Gly Trp Leu Ala Arg Arg Leu Asn Val Pro Val Ile Arg
 210 215 220

gag gtg aca gat gct ccc acc gtg tca acc gat gag ttt ggt act cca 720
 Glu Val Thr Asp Ala Pro Thr Val Ser Thr Asp Glu Phe Gly Thr Pro
 225 230 235 240

ctg ctg gct atc cag cgc ctg gag atc gtt cgc acc acc ggc tcg atc 768
 Leu Leu Ala Ile Gln Arg Leu Glu Ile Val Arg Thr Thr Gly Ser Ile
 245 250 255

atc atc acc atc cat gac gct cat acc ctt cag gta gag atg ccg gaa 816
 Ile Ile Thr Ile His Asp Ala His Thr Leu Gln Val Glu Met Pro Glu
 260 265 270

tcc ggc aat gcc cca tcg ctg gtg gct att ggt cgt cga agt gag tcc 864
 Ser Gly Asn Ala Pro Ser Leu Val Ala Ile Gly Arg Arg Ser Glu Ser
 275 280 285

gac tgc ttg tot gag gag ctt cgc cac atg gat cca gat ttg ggc tac 912
 Asp Cys Leu Ser Glu Glu Leu Arg His Met Asp Pro Asp Leu Gly Tyr
 290 295 300

cag cac gca cta tcc ggc ttg tcc agc gtc aag ctg gaa acc gtc taa 960
 Gln His Ala Leu Ser Gly Leu Ser Ser Val Lys Leu Glu Thr Val
 305 310 315

<210> 8
 <211> 319
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

5

<400> 8
 Met Ile Phe Glu Leu Pro Asp Thr Thr Thr Gln Gln Ile Ser Lys Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Arg Leu Arg Glu Ser Gly Thr Gln Val Thr Thr Gly Arg Val
 20 25 30

10

ES 2 374 837 T3

Leu Thr Leu Ile Val Val Thr Asp Ser Glu Ser Asp Val Ala Ala Val
 35 40 45
 Thr Glu Ser Thr Asn Glu Ala Ser Arg Glu His Pro Ser Arg Val Ile
 50 55 60
 Ile Leu Val Val Gly Asp Lys Thr Ala Glu Asn Lys Val Asp Ala Glu
 65 70 75 80
 Val Arg Ile Gly Gly Asp Ala Gly Ala Ser Glu Met Ile Ile Met His
 85 90 95
 Leu Asn Gly Pro Val Ala Asp Lys Leu Gln His Val Val Thr Pro Leu
 100 105 110
 Leu Leu Pro Asp Thr Pro Ile Val Ala Trp Trp Pro Gly Glu Ser Pro
 115 120 125
 Lys Asn Pro Ser Gln Asp Pro Ile Gly Arg Ile Ala Gln Arg Arg Ile
 130 135 140
 Thr Asp Ala Leu Tyr Asp Arg Asp Asp Ala Leu Glu Asp Arg Val Glu
 145 150 155 160
 Asn Tyr His Pro Gly Asp Thr Asp Met Thr Trp Ala Arg Leu Thr Gln
 165 170 175
 Trp Arg Gly Leu Val Ala Ser Ser Leu Asp His Pro Pro His Ser Glu
 180 185 190
 Ile Thr Ser Val Arg Leu Thr Gly Ala Ser Gly Ser Thr Ser Val Asp
 195 200 205
 Leu Ala Ala Gly Trp Leu Ala Arg Arg Leu Asn Val Pro Val Ile Arg
 210 215 220
 Glu Val Thr Asp Ala Pro Thr Val Ser Thr Asp Glu Phe Gly Thr Pro
 225 230 235 240
 Leu Leu Ala Ile Gln Arg Leu Glu Ile Val Arg Thr Thr Gly Ser Ile
 245 250 255
 Ile Ile Thr Ile His Asp Ala His Thr Leu Gln Val Glu Met Pro Glu
 260 265 270
 Ser Gly Asn Ala Pro Ser Leu Val Ala Ile Gly Arg Arg Ser Glu Ser
 275 280 285

ES 2 374 837 T3

Asp Cys Leu Ser Glu Glu Leu Arg His Met Asp Pro Asp Leu Gly Tyr
 290 295 300

Gln His Ala Leu Ser Gly Leu Ser Ser Val Lys Leu Glu Thr Val
 305 310 315

<210> 9
 <211> 1600
 <212> ADN
 5 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <221> CDS
 <222> (335) .. (1291)
 10 <223> alelo opcA

<220>
 <221> mutación
 <222> (653) .. (653)
 15 <223> transición T -> C

<220>
 <221> mutación
 <222> (736) .. (736)
 20 <223> transición C -> T

<220>
 <221> mutación
 <222> (934) .. (934)
 25 <223> transición T -> C

<220>
 <221> mutación
 <222> (982) .. (982)
 30 <223> transversión G -> C

<220>
 <221> mutación
 <222> (991) .. (991)
 35 <223> transversión A -> C

<220>
 <221> mutación
 <222> (1.031) .. (1.031)
 40 <223> transición C -> T

<220>
 <221> mutación
 <222> (1.115) .. (1.115)
 45 <223> transición T -> C

<400> 9
 gtgtgctcat ccgcttcggg tccaagggtc caggttctgc catggaagtc cgtgacgtca 60
 acatggactt ctctactca gaatccttca ctgaagaatc acctgaagca tacgagcgcc 120
 tcattttgga tgcgctgtta gatgaatcca gcctcttccc taccaacgag gaagtggaac 180

ES 2 374 837 T3

tgagctggaa gattctggat ccaattcttg aagcatggga tgccgatgga gaaccagagg	240
attaccagc gggtagctgg ggtccaaaga gcgctgatga aatgctttcc cgcaacggtc	300
acacctggcg cagggcataa tttaggggca aaaa atg atc ttt gaa ctt ccg gat	355
Met Ile Phe Glu Leu Pro Asp	
1 5	
acc acc acc cag caa att tcc aag acc cta act cga ctg cgt gaa tcg	403
Thr Thr Thr Gln Gln Ile Ser Lys Thr Leu Thr Arg Leu Arg Glu Ser	
10 15 20	
ggc acc cag gtc acc acc ggc cga gtg ctc acc ctc atc gtg gtc act	451
Gly Thr Gln Val Thr Thr Gly Arg Val Leu Thr Leu Ile Val Val Thr	
25 30 35	
gac tcc gaa agc gat gtc gct gca gtt acc gag tcc acc aat gaa gcc	499
Asp Ser Glu Ser Asp Val Ala Ala Val Thr Glu Ser Thr Asn Glu Ala	
40 45 50 55	
tcg cgc gag cac cca tct cgc gtg atc att ttg gtg gtt ggc gat aaa	547
Ser Arg Glu His Pro Ser Arg Val Ile Ile Leu Val Val Gly Asp Lys	
60 65 70	
act gca gaa aac aaa gtt gac gca gaa gtc cgt atc ggt ggc gac gct	595
Thr Ala Glu Asn Lys Val Asp Ala Glu Val Arg Ile Gly Gly Asp Ala	
75 80 85	
ggt gct tcc gag atg atc atc atg cat ctc aac gga cct gtc gct gac	643
Gly Ala Ser Glu Met Ile Ile Met His Leu Asn Gly Pro Val Ala Asp	
90 95 100	
aag ctc cag cat gtc gtc aca cca ctg ttg ctt cct gac acc ccc atc	691
Lys Leu Gln His Val Val Thr Pro Leu Leu Leu Pro Asp Thr Pro Ile	
105 110 115	
gtt gct tgg tgg cca ggt gaa tca cca aag aat cct tcc cag gat cca	739
Val Ala Trp Trp Pro Gly Glu Ser Pro Lys Asn Pro Ser Gln Asp Pro	
120 125 130 135	
att gga cgc atc gca caa cga cgc atc act gat gct ttg tac gac cgt	787
Ile Gly Arg Ile Ala Gln Arg Arg Ile Thr Asp Ala Leu Tyr Asp Arg	
140 145 150	
gat gac gca cta gaa gat cgt gtt gag aac tat cac cca ggt gat acc	835
Asp Asp Ala Leu Glu Asp Arg Val Glu Asn Tyr His Pro Gly Asp Thr	
155 160 165	
gac atg acg tgg gcg cgc ctt acc cag tgg ogg gga ctt gtt gcc tcc	883
Asp Met Thr Trp Ala Arg Leu Thr Gln Trp Arg Gly Leu Val Ala Ser	
170 175 180	
tca ttg gat cac cca cca cac agc gaa atc act tcc gtg agg ctg acc	931
Ser Leu Asp His Pro Pro His Ser Glu Ile Thr Ser Val Arg Leu Thr	
185 190 195	
ggc gca agc ggc agt acc tcg gtg gat ttg gct gca ggc tgg ttg gcg	979
Gly Ala Ser Gly Ser Thr Ser Val Asp Leu Ala Ala Gly Trp Leu Ala	
200 205 210 215	

ES 2 374 837 T3

cgc agg ctg aac gtg cct gtg atc cgc gag gtg aca gat gct ccc acc 1027
 Arg Arg Leu Asn Val Pro Val Ile Arg Glu Val Thr Asp Ala Pro Thr
 220 225 230

 gtg tca acc gat gag ttt ggt act cca ctg ctg gct atc cag cgc ctg 1075
 Val Ser Thr Asp Glu Phe Gly Thr Pro Leu Leu Ala Ile Gln Arg Leu
 235 240 245

 gag atc gtt cgc acc acc ggc tcg atc atc atc acc atc cat gac gct 1123
 Glu Ile Val Arg Thr Thr Gly Ser Ile Ile Ile Thr Ile His Asp Ala
 250 255 260

 cat acc ctt cag gta gag atg ccg gaa tcc ggc aat gcc cca tcg ctg 1171
 His Thr Leu Gln Val Glu Met Pro Glu Ser Gly Asn Ala Pro Ser Leu
 265 270 275

 gtg gct att ggt cgt cga agt gag tcc gac tgc ttg tct gag gag ctt 1219
 Val Ala Ile Gly Arg Arg Ser Glu Ser Asp Cys Leu Ser Glu Glu Leu
 280 285 290 295

 cgc cac atg gat cca gat ttg ggc tac cag cac gca cta tcc ggc ttg 1267
 Arg His Met Asp Pro Asp Leu Gly Tyr Gln His Ala Leu Ser Gly Leu
 300 305 310

 tcc agc gtc aag ctg gaa acc gtc taaggagaaa tacaacacta tggttgatgt 1321
 Ser Ser Val Lys Leu Glu Thr Val
 315

 agtacgcgca cgcgatactg aagatttggt tgcacaggct gcctccaaat tcattgaggt 1381

 tgttgaagca gcaactgcca ataatggcac cgcacaggta gtgctcaccg gtggtggcgc 1441

 cggcatcaag ttgctggaaa agctcagcgt tgatgcggt gacottgctt gggatcgcac 1501

 tcatgtgttc ttggcgatg agcgcaatgt cctgtcagt gattctgagt ccaatgaggg 1561

 ccaggetcgt gaggcaactgt tgtccaaggt ttctatccc 1600

<210> 10
 <211> 319
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

5

<400> 10
 Met Ile Phe Glu Leu Pro Asp Thr Thr Thr Gln Gln Ile Ser Lys Thr
 1 5 10 15

 Leu Thr Arg Leu Arg Glu Ser Gly Thr Gln Val Thr Thr Gly Arg Val
 20 25 30

 Leu Thr Leu Ile Val Val Thr Asp Ser Glu Ser Asp Val Ala Ala Val
 35 40 45

 Thr Glu Ser Thr Asn Glu Ala Ser Arg Glu His Pro Ser Arg Val Ile
 50 55 60

ES 2 374 837 T3

Ile Leu Val Val Gly Asp Lys Thr Ala Glu Asn Lys Val Asp Ala Glu
65 70 75 80

Val Arg Ile Gly Gly Asp Ala Gly Ala Ser Glu Met Ile Ile Met His
85 90 95

Leu Asn Gly Pro Val Ala Asp Lys Leu Gln His Val Val Thr Pro Leu
100 105 110

Leu Leu Pro Asp Thr Pro Ile Val Ala Trp Trp Pro Gly Glu Ser Pro
115 120 125

Lys Asn Pro Ser Gln Asp Pro Ile Gly Arg Ile Ala Gln Arg Arg Ile
130 135 140

Thr Asp Ala Leu Tyr Asp Arg Asp Asp Ala Leu Glu Asp Arg Val Glu
145 150 155 160

Asn Tyr His Pro Gly Asp Thr Asp Met Thr Trp Ala Arg Leu Thr Gln
165 170 175

Trp Arg Gly Leu Val Ala Ser Ser Leu Asp His Pro Pro His Ser Glu
180 185 190

Ile Thr Ser Val Arg Leu Thr Gly Ala Ser Gly Ser Thr Ser Val Asp
195 200 205

Leu Ala Ala Gly Trp Leu Ala Arg Arg Leu Asn Val Pro Val Ile Arg
210 215 220

Glu Val Thr Asp Ala Pro Thr Val Ser Thr Asp Glu Phe Gly Thr Pro
225 230 235 240

Leu Leu Ala Ile Gln Arg Leu Glu Ile Val Arg Thr Thr Gly Ser Ile
245 250 255

Ile Ile Thr Ile His Asp Ala His Thr Leu Gln Val Glu Met Pro Glu
260 265 270

Ser Gly Asn Ala Pro Ser Leu Val Ala Ile Gly Arg Arg Ser Glu Ser
275 280 285

Asp Cys Leu Ser Glu Glu Leu Arg His Met Asp Pro Asp Leu Gly Tyr
290 295 300

Gln His Ala Leu Ser Gly Leu Ser Ser Val Lys Leu Glu Thr Val
305 310 315

ES 2 374 837 T3

	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Corynebacterium glutamicum	
	<220>	
	<221> característica variada	
	<222> (1) .. (20)	
10	<223> cebador opcA-A1	
	<400> 11	
	cacctggcgc aggccataat	20
15	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Corynebacterium glutamicum	
	<220>	
20	<221> característica variada	
	<222> (1) .. (20)	
	<223> cebador opcA-E1	
25	<400> 12	
	cgcgtgcgcg tactacatca	20
30	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Corynebacterium glutamicum	
	<220>	
35	<221> característica variada	
	<222> (1) .. (20)	
	<223> cebador opcA-int1	
	<400> 13	
	acggacctgt cgctgacaag	20
40	<210> 14	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Corynebacterium glutamicum	
45	<220>	
	<221> característica variada	
	<222> (1) .. (20)	
	<223> cebador opcA-int2	
50	<400> 14	
	cggattccgg catctctac	20
55	<210> 15	
	<211> 519	
	<212> ADN	
	<213> Corynebacterium glutamicum	
	<220>	
60	<221> CDS	
	<222> (1) .. (519)	
	<223> marco de lectura	
	<220>	
65	<221> mutación	
	<222> (28) .. (28)	
	<223> C en la posición 28 corresponde a C en la posición 319 de la SEQ ID NO: 5	

ES 2 374 837 T3

<220>
 <221> mutación
 <222> (366) .. (366)
 5 <223> C en la posición 366 corresponde a C en la posición 657 de la SEQ ID NO: 5

<220>
 <221> mutación
 <222> (406) .. (406)
 10 <223> T en la posición 406 corresponde a T en la posición 697 de la SEQ ID NO: 5

<220>
 <221> mutación
 <222> (490) .. (490)
 15 <223> C en la posición 490 corresponde a C en la posición 781 de la SEQ ID NO: 5

<400> 15
 aac gga cct gtc gct gac aag ctc cag cat gtc gtc aca cca ctg ttg 48
 Asn Gly Pro Val Ala Asp Lys Leu Gln His Val Val Thr Pro Leu Leu
 1 5 10 15
 ctt cct gac acc ccc atc gtt gct tgg tgg cca ggt gaa tca cca aag 96
 Leu Pro Asp Thr Pro Ile Val Ala Trp Trp Pro Gly Glu Ser Pro Lys
 20 25 30
 aat cct tcc cag gac cca att gga cgc atc gca caa cga cgc atc act 144
 Asn Pro Ser Gln Asp Pro Ile Gly Arg Ile Ala Gln Arg Arg Ile Thr
 35 40 45
 gat gct ttg tac gac cgt gat gac gca cta gaa gat cgt gtt gag aac 192
 Asp Ala Leu Tyr Asp Arg Asp Asp Ala Leu Glu Asp Arg Val Glu Asn
 50 55 60
 tat cac cca ggt gat acc gac atg acg tgg gcg cgc ctt acc cag tgg 240
 Tyr His Pro Gly Asp Thr Asp Met Thr Trp Ala Arg Leu Thr Gln Trp
 65 70 75 80
 cgg gga ctt gtt gcc tcc tca ttg gat cac cca cca cac agc gaa atc 288
 Arg Gly Leu Val Ala Ser Ser Leu Asp His Pro Pro His Ser Glu Ile
 85 90 95
 act tcc gtg agg ctg acc ggt gca agc ggc agt acc tcg gtg gat ttg 336
 Thr Ser Val Arg Leu Thr Gly Ala Ser Gly Ser Thr Ser Val Asp Leu
 100 105 110

ES 2 374 837 T3

gct gca ggc tgg ttg gcg cgg agg ctg aac gtg cct gtg atc cgc gag 384
 Ala Ala Gly Trp Leu Ala Arg Arg Leu Asn Val Pro Val Ile Arg Glu
 115 120 125

gtg aca gat gct ccc acc gtg tca acc gat gag ttt ggt act cca ctg 432
 Val Thr Asp Ala Pro Thr Val Ser Thr Asp Glu Phe Gly Thr Pro Leu
 130 135 140

ctg gct atc cag cgc ctg gag atc gtt cgc acc acc ggc tcg atc atc 480
 Leu Ala Ile Gln Arg Leu Glu Ile Val Arg Thr Thr Gly Ser Ile Ile
 145 150 155 160

atc acc atc cat gac gct cat acc ctt cag gta gag atg 519
 Ile Thr Ile His Asp Ala His Thr Leu Gln Val Glu Met
 165 170

<210> 16

<211> 173

<212> PRT

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 16

Asn Gly Pro Val Ala Asp Lys Leu Gln His Val Val Thr Pro Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Pro Asp Thr Pro Ile Val Ala Trp Trp Pro Gly Glu Ser Pro Lys
 20 25 30

Asn Pro Ser Gln Asp Pro Ile Gly Arg Ile Ala Gln Arg Arg Ile Thr
 35 40 45

Asp Ala Leu Tyr Asp Arg Asp Asp Ala Leu Glu Asp Arg Val Glu Asn
 50 55 60

Tyr His Pro Gly Asp Thr Asp Met Thr Trp Ala Arg Leu Thr Gln Trp
 65 70 75 80

Arg Gly Leu Val Ala Ser Ser Leu Asp His Pro Pro His Ser Glu Ile
 85 90 95

Thr Ser Val Arg Leu Thr Gly Ala Ser Gly Ser Thr Ser Val Asp Leu
 100 105 110

Ala Ala Gly Trp Leu Ala Arg Arg Leu Asn Val Pro Val Ile Arg Glu
 115 120 125

Val Thr Asp Ala Pro Thr Val Ser Thr Asp Glu Phe Gly Thr Pro Leu
 130 135 140

Leu Ala Ile Gln Arg Leu Glu Ile Val Arg Thr Thr Gly Ser Ile Ile
 145 150 155 160

ES 2 374 837 T3

Ile Thr Ile His Asp Ala His Thr Leu Gln Val Glu Met
 165 170

<210> 17
 <211> 519
 <212> ADN
 5 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (519)
 10 <223> marco de lectura

<220>
 <221> mutación
 <222> (28) .. (28)
 15 <223> C en la posición 28 corresponde a C en la posición 319 de la SEQ ID NO: 7

<220>
 <221> mutación
 <222> (111) .. (111)
 20 <223> T en la posición 111 corresponde a T en la posición 402 de la SEQ ID NO: 7

<220>
 <221> mutación
 <222> (309) .. (309)
 25 <223> C en la posición 309 corresponde a C en la posición 600 de la SEQ ID NO: 7

<220>
 <221> mutación
 <222> (357) .. (357)
 30 <223> C en la posición 357 corresponde a C en la posición 648 de la SEQ ID NO: 7

<220>
 <221> mutación
 <222> (366) .. (366)
 35 <223> C en la posición 366 corresponde a C en la posición 657 de la SEQ ID NO: 7

<220>
 <221> mutación
 <222> (406) .. (406)
 40 <223> T en la posición 406 corresponde a T en la posición 697 de la SEQ ID NO: 7

<220>
 <221> mutación
 <222> (490) .. (490)
 45 <223> C en la posición 490 corresponde a C en la posición 781 de la SEQ ID NO: 7

<400> 17
 aac gga cct gtc gct gac aag ctc cag cat gtc gtc aca cca ctg ttg 48
 Asn Gly Pro Val Ala Asp Lys Leu Gln His Val Val Thr Pro Leu Leu
 1 5 10 15

ctt cct gac acc ccc atc gtt gct tgg tgg cca ggt gaa tca cca aag 96
 Leu Pro Asp Thr Pro Ile Val Ala Trp Trp Pro Gly Glu Ser Pro Lys
 20 25 30

ES 2 374 837 T3

aat cct tcc cag gat cca att gga cgc atc gca caa cga cgc atc act 144
 Asn Pro Ser Gln Asp Pro Ile Gly Arg Ile Ala Gln Arg Arg Ile Thr
 35 40 45
 gat gct ttg tac gac cgt gat gac gca cta gaa gat cgt gtt gag aac 192
 Asp Ala Leu Tyr Asp Arg Asp Asp Ala Leu Glu Asp Arg Val Glu Asn
 50 55 60
 tat cac cca ggt gat acc gac atg acg tgg gcg cgc ctt acc cag tgg 240
 Tyr His Pro Gly Asp Thr Asp Met Thr Trp Ala Arg Leu Thr Gln Trp
 65 70 75 80
 cgg gga ctt gtt gcc tcc tca ttg gat cac cca cca cac agc gaa atc 288
 Arg Gly Leu Val Ala Ser Ser Leu Asp His Pro Pro His Ser Glu Ile
 85 90 95
 act tcc gtg agg ctg acc ggc gca agc ggc agt acc tcg gtg gat ttg 336
 Thr Ser Val Arg Leu Thr Gly Ala Ser Gly Ser Thr Ser Val Asp Leu
 100 105 110
 gct gca ggc tgg ttg gcg cgc agg ctg aac gtg cct gtg atc cgc gag 384
 Ala Ala Gly Trp Leu Ala Arg Arg Leu Asn Val Pro Val Ile Arg Glu
 115 120 125
 gtg aca gat gct ccc acc gtg tca acc gat gag ttt ggt act cca ctg 432
 Val Thr Asp Ala Pro Thr Val Ser Thr Asp Glu Phe Gly Thr Pro Leu
 130 135 140
 ctg gct atc cag cgc ctg gag atc gtt cgc acc acc ggc tcg atc atc 480
 Leu Ala Ile Gln Arg Leu Glu Ile Val Arg Thr Thr Gly Ser Ile Ile
 145 150 155 160
 atc acc atc cat gac gct cat acc ctt cag gta gag atg 519
 Ile Thr Ile His Asp Ala His Thr Leu Gln Val Glu Met
 165 170

<210> 18
 <211> 173
 <212> PRT

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 18
 Asn Gly Pro Val Ala Asp Lys Leu Gln His Val Val Thr Pro Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Pro Asp Thr Pro Ile Val Ala Trp Trp Pro Gly Glu Ser Pro Lys
 20 25 30
 Asn Pro Ser Gln Asp Pro Ile Gly Arg Ile Ala Gln Arg Arg Ile Thr
 35 40 45
 Asp Ala Leu Tyr Asp Arg Asp Asp Ala Leu Glu Asp Arg Val Glu Asn
 50 55 60
 Tyr His Pro Gly Asp Thr Asp Met Thr Trp Ala Arg Leu Thr Gln Trp
 65 70 75 80

ES 2 374 837 T3

Arg Gly Leu Val Ala Ser Ser Leu Asp His Pro Pro His Ser Glu Ile
85 90 95

Thr Ser Val Arg Leu Thr Gly Ala Ser Gly Ser Thr Ser Val Asp Leu
100 105 110

Ala Ala Gly Trp Leu Ala Arg Arg Leu Asn Val Pro Val Ile Arg Glu
115 120 125

Val Thr Asp Ala Pro Thr Val Ser Thr Asp Glu Phe Gly Thr Pro Leu
130 135 140

Leu Ala Ile Gln Arg Leu Glu Ile Val Arg Thr Thr Gly Ser Ile Ile
145 150 155 160

Ile Thr Ile His Asp Ala His Thr Leu Gln Val Glu Met
165 170

- <210> 19
- <211> 1263
- <212> ADN
- 5 <213> Corynebacterium glutamicum

- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(1263)
- 10 <223> gen lysC de tipo silvestre

<400> 19	
gtg gcc ctg gtc gta cag aaa tat ggc ggt tcc tcg ctt gag agt gcg	48
Met Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala	
1 5 10 15	
gaa cgc att aga aac gtc gct gaa cgg atc gtt gcc acc aag aag gct	96
Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala	
20 25 30	
gga aat gat gtc gtg gtt gtc tgc tcc gca atg gga gac acc acg gat	144
Gly Asn Asp Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp	
35 40 45	
gaa ctt cta gaa ctt gca gcg gca gtg aat ccc gtt ccg cca gct cgt	192
Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg	
50 55 60	
gaa atg gat atg ctc ctg act gct ggt gag cgt att tct aac gct ctc	240
Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu	
65 70 75 80	
gtc gcc atg gct att gag tcc ctt ggc gca gaa gcc caa tct ttc acg	288
Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr	
85 90 95	

ES 2 374 837 T3

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

ES 2 374 837 T3

aat gtg ctt tac gac gac cag gtc ggc aaa gtc tcc ctc gtg ggt gct 1056
 Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala
 340 345 350

ggc atg aag tct cac cca ggt gtt acc gca gag ttc atg gaa gct ctg 1104
 Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu
 355 360 365

cgc gat gtc aac gtg aac atc gaa ttg att tcc acc tct gag att cgt 1152
 Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg
 370 375 380

att tcc gtg ctg atc cgt gaa gat gat ctg gat gct gct gca cgt gca 1200
 Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala
 385 390 395 400

ttg cat gag cag ttc cag ctg ggc ggc gaa gac gaa gcc gtc gtt tat 1248
 Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr
 405 410 415

gca ggc acc gga cgc 1263
 Ala Gly Thr Gly Arg
 420

<210> 20

<211> 421

<212> PRT

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 20

Met Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala
 1 5 10 15

Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala
 20 25 30

Gly Asn Asp Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp
 35 40 45

Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg
 50 55 60

Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu
 65 70 75 80

Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr
 85 90 95

Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg
 100 105 110

Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly
 115 120 125

ES 2 374 837 T3

Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg
 130 135 140

Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala
 145 150 155 160

Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val
 165 170 175

Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys
 180 185 190

Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly
 195 200 205

Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn
 210 215 220

Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu
 225 230 235 240

Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr
 245 250 255

Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile
 260 265 270

Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp
 275 280 285

Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu
 290 295 300

Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg
 305 310 315 320

Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr
 325 330 335

Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala
 340 345 350

Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu
 355 360 365

ES 2 374 837 T3

Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg
370 375 380

Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala
385 390 395 400

Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr
405 410 415

Ala Gly Thr Gly Arg

REIVINDICACIONES

- 5 1. Mutantes aislados de bacterias corineformes, que contienen un gen, que codifica el polipéptido glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, realizándose que la secuencia de aminoácidos del polipéptido se escoge entre el conjunto que se compone de
- 10 a) la SEQ ID NO: 6, en la que en la posición 107 de la secuencia de aminoácidos se encuentra L-histidina, en la posición 219 se encuentra L-asparagina, en la posición 233 se encuentra L-serina y en la posición 261 se encuentra L-histidina,
- 15 b) la SEQ ID NO: 6, encontrándose, además de las mencionadas mutaciones, como máximo 5 intercambios conservativos de aminoácidos, y
- c) la SEQ ID NO: 6, encontrándose, además de las mencionadas mutaciones, como máximo 5 inserciones o supresiones.
- 20 2. Mutantes de bacterias corineformes de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizados porque en el caso de las bacterias corineformes se trata de una bacteria que se escoge entre el conjunto que se compone de *Corynebacterium efficiens*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, y *Corynebacterium aminogenes*.
- 25 3. Mutantes de bacterias corineformes de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizados porque se trata de *Corynebacterium glutamicum*.
4. Mutantes de bacterias corineformes de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2 ó 3, caracterizados porque se trata de bacterias que segregan L-aminoácidos.
- 30 5. Mutantes de bacterias corineformes de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizados porque se trata de bacterias corineformes que segregan L-lisina o L-triptófano.
- 35 6. Mutantes de bacterias corineformes de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 hasta 5, caracterizados porque el gen abarca una secuencia de nucleótidos, que es idéntica a la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido, que es obtenible mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediando utilización de un ADN obtenido a partir de una bacteria corineforme y mediando utilización de un par de cebadores, que se compone de un primer cebador, que abarca por lo menos 15 nucleótidos consecutivos, que se escogen a partir de la secuencia de nucleótidos situada entre las posiciones 1 y 334 de la SEQ ID NO: 3, y de un segundo cebador, que abarca por lo menos 15 nucleótidos consecutivos, que se escogen a partir de la secuencia de nucleótidos situada entre las posiciones 1.600 y 1.292 de la SEQ ID NO: 3.
- 40 7. Mutantes de bacterias corineformes de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 hasta 5, caracterizados porque el gen abarca una secuencia de nucleótidos, que es idéntica por lo menos en un 90 % a las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7.
- 45 8. Mutantes de bacterias corineformes de acuerdo con las reivindicaciones 6 y 7, caracterizados porque el gen abarca la secuencia de nucleótidos, que es idéntica en un 100 % a la SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7.
- 50 9. Polinucleótido aislado, que codifica el polipéptido de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, realizándose que la secuencia de aminoácidos del polipéptido se escoge entre el conjunto que se compone de
- 55 a) la SEQ ID NO: 6, en la que en la posición 107 de la secuencia de aminoácidos se encuentra L-histidina, en la posición 219 se encuentra L-asparagina, en la posición 233 se encuentra L-serina y en la posición 261 se encuentra L-histidina,
- 60 b) la SEQ ID NO: 6, encontrándose, además de las mencionadas mutaciones, como máximo 5 intercambios conservativos de aminoácidos, y
- c) la SEQ ID NO: 6, encontrándose, además de las mencionadas mutaciones, como máximo 5 inserciones o supresiones.
- 65 10. Polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque es idéntico a la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido, que se obtiene mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediando utilización de un ADN obtenido a partir de una bacteria corineforme y mediando utilización de un par de

cebadores, que se compone de un primer cebador, que abarca por lo menos 15 nucleótidos consecutivos, que se escogen a partir de la secuencia de nucleótidos situada entre las posiciones 1 y 334 de la SEQ ID NO: 3, y de un segundo cebador, que abarca por lo menos 15 nucleótidos consecutivos que se escogen a partir de la secuencia complementaria de nucleótidos situada entre las posiciones 1.600 y 1.292 de la SEQ ID NO: 3.

- 5
11. Polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque se hibrida en condiciones rigurosas con una secuencia de nucleótidos complementaria a la SEQ ID NO: 5, comprendiendo las condiciones rigurosas una etapa de lavado con un tampón que corresponde a 2xSSC a una temperatura de 52°C a 68°C.
- 10
12. Polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 9, estando el polinucleótido caracterizado porque abarca una secuencia de nucleótidos, que es idéntica por lo menos en un 90 % a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7.
- 15
13. Polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque el polinucleótido abarca una secuencia de nucleótidos, que es idéntica por lo menos en un 96 % a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5.
- 20
14. Polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado porque se abarcan las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7.
15. Polinucleótido aislado, caracterizado porque codifica por lo menos un marco de lectura con una secuencia de aminoácidos que corresponde a las posiciones 98 hasta 270 de la SEQ ID NO: 6.
- 25
16. Polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado porque contiene una o varias mutaciones mudas.
17. Polinucleótido aislado de acuerdo con las reivindicaciones 15 ó 16, caracterizado porque abarca por lo menos la secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 292 hasta 810 de la SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7.
- 30
18. Un microorganismo recombinante, que contiene el polinucleótido aislado de acuerdo con las reivindicaciones 9 hasta 17, o que se había producido mediante su utilización.
- 35
19. Microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 18, caracterizado porque se trata de una bacteria corineforme o de una bacteria del género *Escherichia coli*.
20. Microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 19, caracterizado porque en el caso de la bacteria corineforme se trata del género *Corynebacterium*.
- 40
21. Microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 20, caracterizado porque en el caso de la bacteria del género *Corynebacterium* se trata de la especie *Corynebacterium glutamicum*.
22. Un vector, que contiene el polinucleótido aislado de acuerdo con las reivindicaciones 9 hasta 17.
- 45
23. Un microorganismo recombinante, que contiene el vector de acuerdo con la reivindicación 22.
24. Microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 23, caracterizado porque se trata de una bacteria corineforme o de una bacteria del género *Escherichia*.
- 50
25. Microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 24, caracterizado porque en el caso de la bacteria corineforme se trata del género *Corynebacterium*.
26. Microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 25, caracterizado porque en el caso de la bacteria del género *Corynebacterium* se trata de la especie *Corynebacterium glutamicum*.
- 55
27. Bacteria corineforme recombinante, que contiene en su cromosoma un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 9, realizándose que se sobreexpresa el mencionado polinucleótido mediante unión con un promotor.
28. Procedimiento para la producción de un L-aminoácido, caracterizado porque se fermenta una bacteria corineforme aislada de acuerdo con las reivindicaciones 1-8, 18-21, 23-27 en un medio adecuado.
- 60
29. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 28, caracterizado porque se aísla o recoge el L-aminoácido deseado.
- 65
30. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 29, caracterizado porque se purifica el L-aminoácido deseado.

31. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 28 hasta 30, caracterizado porque el L-aminoácido deseado se aísla o se recoge en común con los componentes del caldo de fermentación y/o con la biomasa (> 0 a 100 %).

32. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 28, caracterizado porque

5 a) la biomasa se elimina a partir del caldo de fermentación en una proporción de 0 a 100 %, y

10 b) a partir del caldo obtenido de esta manera se produce un producto que está esencialmente seco y conformado, mediante un método que se escoge entre el conjunto que se compone de granulación, compactación, desecación por atomización y extrusión.

15 33. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22, caracterizado porque, antes o después de la etapa a), al caldo de fermentación se le añade un ácido que se escoge entre el conjunto que se compone de ácido sulfúrico, ácido clorhídrico y ácido fosfórico.

34. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 32, caracterizado porque a partir del caldo, que se ha obtenido antes o después de la etapa a), se elimina el agua.

20 35. Procedimiento de acuerdo con la etapa 32, caracterizado porque el producto conformado obtenido en o durante la etapa b) es rociado con un aceite.

36. La cepa DM 1825 de *Corynebacterium glutamicum* depositada bajo el n° DSM 17223 en la DSMZ (Braunschweig).

Figura 1: Plásmido pCRII_opcAaa4ex

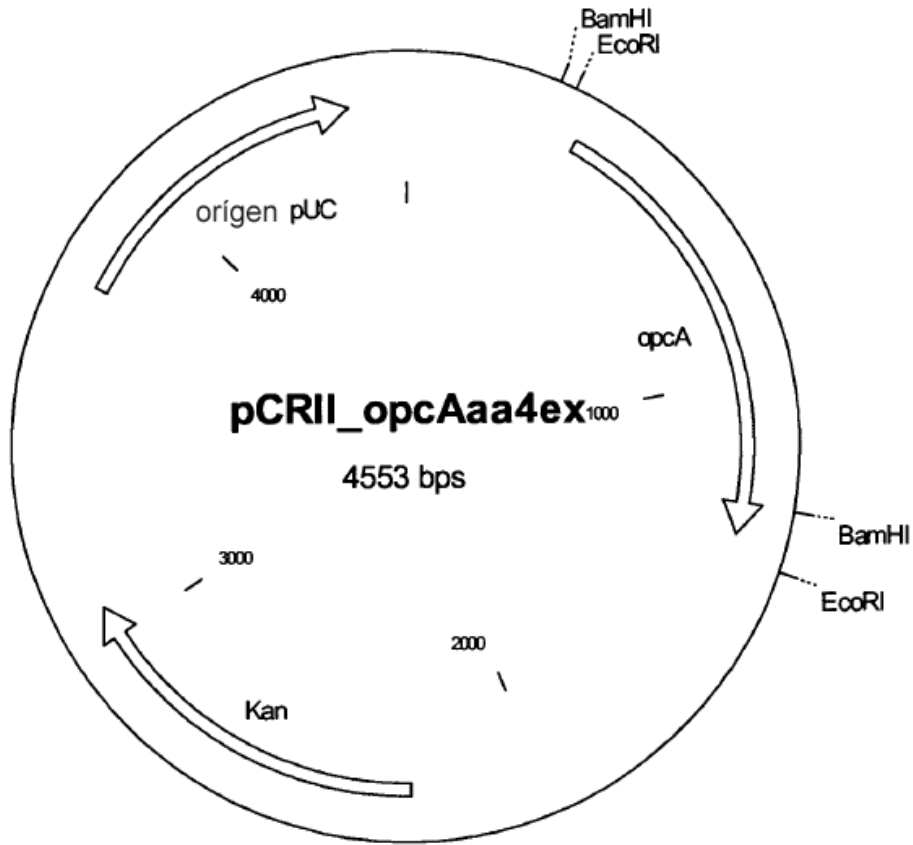


Figura 2: Plásmido pK18mobsacB_opcAaa4ex

