



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 382 363**

⑯ Int. Cl.:
C12N 9/12
(2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- ⑯ Número de solicitud europea: **07786778 .6**
⑯ Fecha de presentación: **20.06.2007**
⑯ Número de publicación de la solicitud: **2041276**
⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.2009**

⑭ Título: **Procedimiento para la producción de L-aminoácidos mediante mutantes del gen gltA que codifica la citrato sintasa**

⑯ Prioridad:
13.07.2006 DE 102006032634

⑬ Titular/es:
**EVONIK DEGUSSA GMBH
RELLINGHAUSER STRASSE 1-11
45128 ESSEN, DE**

⑭ Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.06.2012

⑬ Inventor/es:
**BATHE, Brigitte y
CLAES, Wilfried**

⑭ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.06.2012

⑬ Agente/Representante:
Lehmann Novo, Isabel

ES 2 382 363 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

Procedimiento para la producción de L-aminoácidos mediante mutantes del gen *gltA* que codifica la citrato sintasa

5 Son objeto del invento unos nuevos polinucleótidos, que codifican un polipéptido con una actividad de citrato sintasa, unas bacterias, que contienen a éstos, y un procedimiento para la producción de aminoácidos mediando utilización de estas bacterias.

10 **Estado de la técnica**

10 Los aminoácidos encuentran utilización en la medicina humana, en la industria farmacéutica, en la industria alimentaria y muy especialmente 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, 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 p.ej. las de agitación y abastecimiento con oxígeno, o a la composición de los medios nutritivos, tal como p.ej. la concentración de azúcares durante la fermentación, o el tratamiento para dar la forma del producto mediante p.ej. una cromatografía con intercambio de iones o 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 a unos antimetabolitos o que son auxótrofas para unos metabolitos importantes para regulación y que producen los aminoácidos. Un antimetabolito conocido es el compuesto análogo a lisina S-(2-amino-etil)-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 del género *Corynebacterium* que producen L-aminoácidos, en particular de *Corynebacterium glutamicum*, mediante el recurso de que se amplifican unos genes individuales para la biosíntesis 30 de los aminoácidos ramificados, y se investiga la repercusión sobre la producción de aminoácidos.

35 Unos artículos recopilativos acerca de la biología, la genética y la biotecnología de *Corynebacterium glutamicum* se encuentran en la obra "Handbook of *Corynebacterium glutamicum*" (Manual de *Corynebacterium glutamicum*) (coordinadores de edición: L. Eggeling y M. Bott, CRC Press, Taylor & Francis, 2005), en la edición especial del Journal of Biotechnology (coordinador de edición jefe: A. Pühler) con el título "A New Era in *Corynebacterium glutamicum* Biotechnology" (Una nueva era en la biotecnología de *Corynebacterium glutamicum*) (Journal of Biotechnolgy 104/1-3, (2003)) y en la obra de T. Schepel (coordinador administrativo) "Microbial Production of L-Amino Acids" (Producción microbiana de L-aminoácidos) (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 79, Editorial Springer, Berlín, Alemania, 2003).

40 40 La secuencia de nucleótidos del genoma de *Corynebacterium glutamicum* ha sido descrita por Ikeda y Nakagawa (Applied Microbiology and Biotechnology 62, 99-109 (2003)), en el documento de patente europea EP 1 108 790 y en la cita de Kalinowski y colaboradores (Journal of Biotechnolgy 104/1-3, (2003)).

45 45 La secuencia de nucleótidos del genoma de *Corynebacterium efficiens* ha sido descrita por Nishio y colaboradores (Genome Research. 13 (7), 1572-1579 (2003)).

50 50 Las secuencias de nucleótidos de los genomas de *Corynebacterium glutamicum* y de *Corynebacterium efficiens* son accesibles asimismo en el Banco de Datos del National Center for Biotechnology Information (Centro nacional para información de biotecnología) (NCBI) de la National Library of Medicine (Biblioteca nacional de medicina) (Bethesda, MD, EE.UU.), en el DNA Data Bank of Japan (Banco de datos de ADN de Japón) (DDBJ, Mishima, Japón) o en el Banco de datos de secuencias de nucleótidos de los European Molecular Biologies Laboratories (Laboratorios europeos de biología molecular) (EMBL, Heidelberg, Alemania o respectivamente Cambridge, Reino Unido).

55 55 La secuencia de tipo silvestre, conocida a partir del estado de la técnica, de la región codificadora del gen *gltA* de *Corynebacterium glutamicum* se representa en la SEQ ID NO: 1 en la parte descriptiva de la presente solicitud de patente. En las SEQ ID NO: 3 y 25 se representan además de esto las secuencias que están situadas corriente arriba y corriente abajo de la región codificadora. La secuencia de aminoácidos del polipéptido GltA codificado (la citrato sintasa) se reproduce de manera correspondiente en las SEQ ID NO: 2, 4 y 26.

60 **Misión del invento**

65 Los autores del invento se han planteado la misión de poner a disposición unas nuevas medidas técnicas para realizar una mejorada producción de L-aminoácidos, de manera preferida de L-lisina, L-valina y L-isoleucina, de manera especialmente preferida de L-lisina.

Descripción del invento

- Un objeto del invento es un polinucleótido aislado, que codifica un polipéptido, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2, habiendo sido reemplazado el L-ácido aspártico en la posición 5 de la secuencia de aminoácidos por L-valina y poseyendo el polipéptido una actividad de citrato sintasa (nº de EC 4.1.3.7). Eventualmente, el polipéptido contiene uno o varios intercambios conservativos de aminoácidos, permaneciendo la actividad de citrato sintasa del polipéptido esencialmente inalterada por los intercambios conservativos de aminoácidos.
- Por el concepto de "aminoácidos proteinógenos" 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 unos L-aminoácidos, escogidos entre el conjunto que se compone de L-ácido aspártico, L-asparagina, L-treonina, L-serina, L-ácido glutámico, L-glutamina, glicina, L-alanina, L-cisteína, L-valina, L-metionina, L-isoleucina, L-leucina, L-tirosina, L-fenilalanina, L-histidina, L-lisina, L-triptófano, L-prolina y L-arginina.
- Los conceptos de polipéptido y proteína son utilizados como sinónimos.
- Además, son un objeto del invento unos vectores y unas bacterias, de manera preferida de los géneros *Corynebacterium* y *Escherichia*, de manera especialmente preferida de las especies *Corynebacterium glutamicum* y *Escherichia coli*, que contienen el mencionado polinucleótido o que habían sido producidos mediando utilización del mencionado polinucleótido.
- Finalmente, son un objeto del invento unas bacterias, de manera preferida de los géneros *Corynebacterium* y *Escherichia*, de manera especialmente preferida de las especies *Corynebacterium glutamicum* y *Escherichia coli*, que han sido transformadas con el mencionado vector.
- El concepto de "transformación" abarca todos los métodos para realizar la transferencia de polinucleótidos, en particular de un ADN, a una bacteria deseada. A éstos pertenecen, entre otros, la utilización de un ADN aislado en el caso de la transformación, la electrotransformación o respectivamente la electroporación, la transferencia mediante contacto con las células tal como en el caso de la conjugación o la transferencia de ADN mediante bombardeo con partículas.
- Otro aspecto adicional del invento se refiere a una bacteria, en particular a una bacteria recombinante, del género *Corynebacterium*, que contiene un polinucleótido, que codifica un polipéptido con una actividad de citrato sintasa, que abarca la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2, estando contenida la L-valina en la posición 5 de la secuencia de aminoácidos. Eventualmente, el polipéptido contiene uno o varios intercambios conservativos de aminoácidos, permaneciendo la actividad de citrato sintasa del polipéptido esencialmente inalterada por los intercambios conservativos de aminoácidos.
- Otro aspecto del invento se refiere a un procedimiento para la producción de L-aminoácidos, de manera preferida de L-lisina, L-valina y L-isoleucina, de manera especialmente preferida de L-lisina, caracterizado porque abarca las siguientes etapas.
- fermentación de las bacterias recombinantes conformes al invento del género *Corynebacterium glutamicum* en un medio nutritivo adecuado, y
 - acumulación del L-aminoácido en el medio nutritivo o en las células de las bacterias.
- Por el concepto de "L-aminoácidos" se entienden los aminoácidos proteinógenos.
- Cuando en lo sucesivo se mencione la L-lisina o lisina, por este concepto se piensa no sólo en las bases, sino también en las sales, tales como p.ej. monohidrocloruro de L-lisina o sulfato de L-lisina.
- En el caso de las bacterias del género *Corynebacterium* se prefieren las cepas que segregan L-aminoácidos, que se basan en las siguientes especies:
- 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,
- prefiriéndose muy especialmente la especie *Corynebacterium glutamicum*.

Algunos representantes de la especie *Corynebacterium glutamicum* son conocidos dentro del estado de la técnica también por otras denominaciones. A éstas pertenecen, por ejemplo:

5 *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870,
 Corynebacterium lilium DSM20137,
 Corynebacterium melassecola ATCC17965,
 Brevibacterium flavum ATCC14067,
 Brevibacterium lactofermentum ATCC13869, y
 Brevibacterium divaricatum ATCC14020.

10 Unos representantes conocidos de cepas del género *Corynebacterium*, que segregan aminoácidos, son, por ejemplo, las cepas que producen L-lisina:

15 *Corynebacterium glutamicum* DM58-1/pDM6 (= DSM4697) descrita en el documento 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)),
 Corynebacterium glutamicum AHP-3 (= FERM BP-7382) descrita en el documento EP 1 108 790,
 Corynebacterium glutamicum DSM16834 descrita en el documento (PCT/EP2005/012417),
 Corynebacterium glutamicum DSM17119 descrita en el documento (PCT/EP2006/060851),
 20 *Corynebacterium glutamicum* DSM17223 descrita en el documento (PCT/EP2006/062010),
 Corynebacterium glutamicum DSM16937 descrita en el documento (PCT/EP2005/057216), y
 Corynebacterium thermoaminogenes AJ12521 (= FERM BP-3304) descrita en el documento de patente de los EE.UU. US 5.250.423;

25 o las cepas que producen L-valina:

Brevibacterium lactofermentum FERM BP-1763 descrita en el documento US 5.188.948,
 Brevibacterium lactofermentum FERM BP-3007 descrita en el documento US 5.521.074,
 30 *Corynebacterium glutamicum* FERM BP-3006 descrita en el documento US 5.521.074, y
 Corynebacterium glutamicum FERM BP-1764 descrita en el documento US 5.188.948;

 o las cepas que producen L-isoleucina:

35 *Brevibacterium flavum* FERM-BP 759 descrita en el documento US 4.656.135,
 Corynebacterium glutamicum FERM-BP 757 descrita en el documento US 4.656.135,
 Brevibacterium flavum FERM-BP 760 descrita en el documento US 4.656.135,
 Corynebacterium glutamicum FERM-BP 758 descrita en el documento US 4.656.135,
 40 *Brevibacterium flavum* FERM BP-2215 descrita en el documento US 5.705. 370, y
 Brevibacterium flavum FERM BP-2433 descrita en el documento US 5.705. 370.

45 Se encuentran datos acerca de 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)), de Liebl y colaboradores (International Journal of Systematic Bacteriology, 41, 255-260 (1991)) y en el documento US 5.250.434.

50 45 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). La cepa de *Corynebacterium thermoaminogenes* (FERM BP-1539) se describe en el documento US-A 5.250.434.

55 60 55 Para la producción de los polinucleótidos conformes al invento se pueden utilizar procedimientos clásicos de mutagénesis in vivo con unas poblaciones celulares de bacterias del género *Corynebacterium* mediando utilización de sustancias mutágenas tales como, por ejemplo, la N-metil-N'-nitro-N-nitroso-guanidina (MNNG), o de luz ultravioleta. Unos métodos de mutagénesis se describen, por ejemplo, en la obra "Manual of 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).

65 65 A partir de la población de células mutagenizadas se sacan y multiplican aquellos mutantes, que necesitan L-ácido glutámico o ácido cítrico, para poder crecer sobre un agar mínimo o cuyo crecimiento sobre un agar mínimo es mejorado por adición de L-ácido glutámico o respectivamente de ácido cítrico. Asimismo es posible, partiendo de los mutantes que necesitan L-ácido glutámico o respectivamente ácido cítrico, aislar los denominados revertantes, que

no necesitan ni L-ácido glutámico ni respectivamente ácido cítrico para su crecimiento. Estos mutantes auxotrofos para L-ácido glutámico o respectivamente ácido cítrico o respectivamente sus revertentes son investigados a continuación. Los detalles técnicos acerca del aislamiento de mutantes con una actividad defectuosa de citrato sintasa se pueden consultar, por ejemplo, en la cita de Shiio y colaboradores (Agricultural and Biological Chemistry 46(1), 101-107 (1982)).

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 (PCR = acrónimo de Polymerase chain reaction), mediando utilización de unos pares de cebadores, que permiten la amplificación del gen *gltA* o respectivamente del alelo *gltA*, se sintetiza y aísla el correspondiente polinucleótido.

A este fin, 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 región codificadora y de la secuencia de nucleótidos complementaria con aquélla (véanse las SEQ ID NOs:3 y 25). 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, escogidos entre la secuencia de nucleótidos que se encuentra entre las posiciones 1 y 1.000 de la SEQ ID NO:25. El segundo cebador correspondiente de un par de cebadores comprende por lo menos 15, por lo menos 18, por lo menos 20, por lo menos 21 o por lo menos 24 nucleótidos consecutivos, escogidos a partir de la secuencia complementaria de nucleótidos entre las posiciones 3.314 y 2.312 de la SEQ ID NO:25.

Unas instrucciones e informaciones acerca de la PCR las encuentra 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 Diefenbach y Dveksler "PCR Primer - a laboratory manual" (Cebadores de PCR - un manual de laboratorio) (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).

Otras instrucciones adicionales acerca de la PCR se encuentran, por ejemplo, en el documento de solicitud de patente internacional WO 06/100177 en las páginas 15 hasta 17.

En otra etapa de trabajo se determina luego la secuencia de nucleótidos del polinucleótido. Ésta se puede determinar, por ejemplo, según el procedimiento de rotura de cadenas 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)).

El polipéptido codificado por esta secuencia de nucleótidos se puede analizar luego 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 en las oficinas de patentes, por ejemplo, en 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)).

Asimismo es posible producir el polinucleótido conforme al invento, que en lo sucesivo será designado también como el alelo *gltA* conforme al invento, por métodos de genética in vitro.

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), o el empleo de una reacción en cadena de la polimerasa mediando 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.). Además, se pueden emplear oligonucleótidos mutágenos, tales como los que se describen en las citas de T. A. Brown (Gentechnologie für Einsteiger (Tecnología genética para principiantes) editorial Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1993) y de R. M. Horton (PCR-mediated Recombination and Mutagenesis (Recombinación y mutagénesis mediadas por PCR), Molecular Biotechnology 3, 93-99 (1995). Asimismo, se puede emplear el método descrito por Papworth y colaboradores ((Strategies 9(3), 3-4 (1996)) mediando utilización del estuche para mutagénesis dirigida a un sitio de cambio rápido (en inglés "Quik Change Site-directed Mutagenesis Kit" de la entidad Stratagene (La Jolla, California, EE.UU.)).

Métodos para la determinación de la actividad de citrato sintasa se pueden consultar en las citas de Eikmanns y colaboradores (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) y de Shiio y colaboradores (Agricultural and Biological Chemistry 46(1), 101-107 (1982)).

Además, es posible sobreexpresar el alelo conforme al invento de la citrato sintasa en *Corynebacterium glutamicum* o en *Escherichia coli*, por ejemplo, con el fin de producirlo a continuación en una forma purificada o respectivamente aislada.

- 5 De esta manera se aisló un polinucleótido, que tiene la secuencia de nucleótidos representada en la SEQ ID NO:5. El polipéptido codificado por este polinucleótido se representa en las SEQ ID NO:6 y 8. Él contiene L-valina en lugar de L-ácido aspártico en la posición 5 de la secuencia de aminoácidos.
- 10 Se encontró, que la cepa ATCC13032, cuando ella, en lugar del gen *gltA* de tipo silvestre, está provista del alelo *gltA* conforme al invento, que codifica la citrato sintasa de acuerdo con la SEQ ID NO:6 (ATCC13032::*gltA* D5V), en comparación con la cepa ATCC13032 de tipo silvestre, que contiene la citrato sintasa de acuerdo con la SEQ ID NO:2, tiene una actividad enzimática disminuida aproximadamente en un 40 % hasta como máximo aproximadamente en un 90 %, de manera preferida una actividad enzimática disminuida aproximadamente en un 70 % hasta como máximo aproximadamente en un 90 %.
- 15 Es conocido el hecho de que unos intercambios conservativos de aminoácidos sólo modifican insignificantemente la actividad enzimática. De manera correspondiente, un objeto del invento son también unos polinucleótidos, que codifican unos polipéptidos con una actividad de citrato sintasa, que contienen, adicionalmente a los intercambios de aminoácidos conformes al invento en la posición 5 de la secuencia de aminoácidos, uno (1) o varios intercambio(s) conservativo(s) de aminoácidos, que no modifica(n) esencialmente a la actividad enzimática. Es decir, que ella permanece en lo esencial inalterada. El concepto de "esencialmente no modificada" o respectivamente "en lo esencial inalterada" significa, en este contexto, que la actividad de citrato sintasa del polipéptido es modificada en como máximo un 20 %, de manera preferida en como máximo un 10 % y de manera especialmente preferida en como máximo un 5 % hasta en como máximo un 2 %, en comparación con la actividad de citrato sintasa del polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO:10 o la SEQ ID NO:6, de manera preferida la SEQ ID NO:6.
- 20 Para un ensayo experimental, el gen *gltA* de la cepa ATCC 13032 se reemplaza por el alelo *gltA*, que codifica un polipéptido que contiene el intercambio de aminoácidos conforme al invento en la posición 5 y uno o varios intercambio(s) conservativo(s) de aminoácidos. A continuación, se cultiva la cepa, se produce un extracto celular y se determina la actividad de citrato sintasa. Como referencia se determina la actividad de citrato sintasa en la cepa ATCC13032::*gltA* D5V.
- 25 En lugar de la cepa ATCC13032 se pueden emplear también unas cepas, que segregan L-lisina de *Corynebacterium glutamicum*, que contienen la región codificadora del gen *gltA* de tipo silvestre, inclusive las secuencias de nucleótidos situadas corriente arriba, correspondientemente a la secuencia de nucleótidos situada entre las posiciones 1 y 2.064 de la SEQ ID NO:3, que de manera preferida contienen la SEQ ID NO:3. Unas cepas adecuadas son, por ejemplo, la DSM16833 que se ha descrito en el documento PCT/EP2005/012417, la DSM13994, que se ha descrito en el documento de solicitud de patente europea EP 1.239.040 A2 o la DSM17576, que se ha descrito en el documento de solicitud de patente alemana DE 102005045301. En estas cepas, mediante intercambio de alelos se puede(n) introducir la(s) correspondiente(s) mutación (mutaciones) en la región codificadora del gen *gltA*.
- 30 Asimismo, es posible purificar los polipéptidos y llevar a cabo los ensayos comparativos en los polipéptidos purificados.
- 35 La enzima citrato sintasa (nº de EC 4.1.3.7) cataliza la reacción de condensación de un oxalacetato y de acetil-CoA, formándose como productos de reacción ácido cítrico y la coenzima A (CoA). En la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Enciclopedia de Kyoto de genes y genomas) (KEGG, Kanehisa Laboratory, Bioinformatics Center, Institute for Chemical Research, Kyoto University, Japón) a esta enzima se le asigna el nº de EC 2.3.3.1.
- 40 En el caso de los L-aminoácidos aromáticos se habla de intercambios conservativos, cuando la L-fenil-alanina, el L-triptófano y la L-tirosina se intercambian entre sí. En el caso de los L-aminoácidos hidrófobos, se habla de intercambios conservativos, cuando la L-leucina, la L-isoleucina y la L-valina se intercambian entre sí. En el caso de los L-aminoácidos polares se habla de intercambios conservativos, cuando la L-glutamina y la L-asparagina se intercambian entre sí. En el caso de los aminoácidos de carácter básico se habla de intercambios conservativos, cuando la L-arginina, la L-lisina y la L-histidina se intercambian entre sí. En el caso de los L-aminoácidos de carácter ácido se habla de intercambios conservativos, cuando el L-ácido aspártico y el L-ácido glutámico se intercambian entre sí. En el caso de los L-aminoácidos que contienen grupos hidroxilo, se habla de intercambios conservativos cuando la L-serina y la L-treonina se intercambian entre sí.
- 45 De manera preferida, el polipéptido contiene a lo sumo dos (2), a lo sumo tres (3), a lo sumo cuatro (4) o a lo sumo cinco (5) intercambios conservativos de aminoácidos, adicionalmente al intercambio conforme al invento en la posición 5 de la SEQ ID NO:2.
- 50 En el caso de los L-aminoácidos aromáticos se habla de intercambios conservativos, cuando la L-fenil-alanina, el L-triptófano y la L-tirosina se intercambian entre sí. En el caso de los L-aminoácidos hidrófobos, se habla de intercambios conservativos, cuando la L-leucina, la L-isoleucina y la L-valina se intercambian entre sí. En el caso de los L-aminoácidos polares se habla de intercambios conservativos, cuando la L-glutamina y la L-asparagina se intercambian entre sí. En el caso de los aminoácidos de carácter básico se habla de intercambios conservativos, cuando la L-arginina, la L-lisina y la L-histidina se intercambian entre sí. En el caso de los L-aminoácidos de carácter ácido se habla de intercambios conservativos, cuando el L-ácido aspártico y el L-ácido glutámico se intercambian entre sí. En el caso de los L-aminoácidos que contienen grupos hidroxilo, se habla de intercambios conservativos cuando la L-serina y la L-treonina se intercambian entre sí.
- 55 De manera preferida, el polipéptido contiene a lo sumo dos (2), a lo sumo tres (3), a lo sumo cuatro (4) o a lo sumo cinco (5) intercambios conservativos de aminoácidos, adicionalmente al intercambio conforme al invento en la posición 5 de la SEQ ID NO:2.
- 60 De manera preferida, el polipéptido contiene a lo sumo dos (2), a lo sumo tres (3), a lo sumo cuatro (4) o a lo sumo cinco (5) intercambios conservativos de aminoácidos, adicionalmente al intercambio conforme al invento en la posición 5 de la SEQ ID NO:2.
- 65 Es conocido que la metionina situada en un extremo, es eliminada en el caso de la síntesis de proteínas por unas enzimas propias del anfitrión, las denominadas aminopeptidasas.

- 5 Los polinucleótidos aislados, que codifican la variante conforme al invento de la citrato sintasa, o unas partes de ésta, se pueden utilizar para producir unas cepas recombinantes del género *Corynebacterium*, de manera especialmente preferida de *Corynebacterium glutamicum*, que contienen el intercambio de aminoácidos conforme al invento en la posición 5 de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la citrato sintasa, y que, en comparación con la cepa de partida o respectivamente parental, entregan L-aminoácidos de manera mejorada al medio circundante o los acumulan en el interior de las células.
- 10 10 De manera preferida, se utilizan aquellas cepas de partida, que ya poseen la capacidad de segregar por lo menos 1 g/l, de manera preferida por lo menos 5 g/l, de manera especialmente preferida por lo menos 10 g/l del L-aminoácido deseado al medio nutritivo circundante.
- 15 15 Un método propagado para la incorporación de mutaciones en genes de bacterias del género *Corynebacterium*, en particular de la especie *Corynebacterium glutamicum*, es el del intercambio de alelos, que se conoce también bajo la denominación de "reemplazo de genes" (en inglés "gene replacement"). En el caso de este procedimiento, un fragmento de ADN, que contiene la mutación que interesa, es transferido a la cepa deseada 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 presente en la respectiva cepa, se intercambia por la secuencia mutada.
- 20 20 20 El fragmento de ADN, que contiene la mutación que interesa, se presenta en el caso de este método típicamente dentro de un vector, en particular de 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, es decir en condiciones selectas de cultivación. 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*.
- 25 25 25 Ejemplos de tales vectores de plásmidos son los vectores pK*mob y pK*mobsacB, tales como, por ejemplo el pk18mobsacB, descritos por Schäfer y colaboradores (Gene 145, 69-73 (1994)) y los vectores descritos en los documentos WO 02/070685 y WO 03/014362. Éstos son capaces de replicarse en *Escherichia coli*, pero no en *Corynebacterium*. 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 sucrasa) 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. Éstos hacen posible la selección en cuanto a unos sucesos de recombinación, en los que el vector es eliminado desde el cromosoma.
- 30 30 30 Además, por Nakamura y colaboradores (documento US 6.303.383) se describió un plásmido sensible frente a la temperatura para *Corynebacterium*, que sólo se puede replicar a unas temperaturas situadas por debajo de 31°C. Asimismo, éste también se puede emplear para las medidas técnicas del invento.
- 35 35 35 40 40 40 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 *Corynebacterium*. Eventualmente, la transferencia del ADN se puede alcanzar también mediante métodos balísticos (p.ej. un bombardeo con partículas).
- 45 45 45 50 50 50 Después de una recombinación homóloga por medio de un primer suceso de cruzamiento, que conduce a una integración, y de un segundo adecuado suceso de cruzamiento que da lugar a una escisión en el gen diana o respectivamente en la secuencia diana, se consigue la incorporación de la mutación y se obtiene una bacteria recombinante. Por el concepto de "gen diana" se designa a un gen, en el que se debe de efectuar el intercambio deseado.
- 55 55 55 60 60 60 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, de la reacción en cadena de la polimerasa, de la determinación de secuencias, el método de la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (en inglés "Fluorescence Resonance Energy Transfer", (FRET)) (Lay y colaboradores Clinical Chemistry 43, 2262-2267 (1997) o los métodos de la enzimología.
- 65 65 65 65 65 65 Este método fue utilizado por Schwarzer y Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991) para incorporar un alelo *lysA*, que llevaba una supresión, y 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 Nakagawa y colaboradores (documento EP 1108790) y por Ohnishi y colaboradores (Applied Microbiology and Biotechnology 58(2), 217-223 (2002)) para incorporar diferentes mutaciones partiendo de los alelos o respectivamente polinucleótidos aislados en el cromosoma de *C. glutamicum*. De esta manera,

Nakagawa y colaboradores consiguieron incorporar una mutación designada como Val59Ala en el gen de la homoserina deshidrogenasa (hom), una mutación designada como Thr311Ile en el gen de la aspartato cinasa (lysC o respectivamente ask), una mutación designada como Pro458Ser en el gen de la piruvato carboxilasa (pyc) y una mutación designada como Ala213Thr en el gen de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (zwf) de *C. glutamicum*.

- 5 Para la incorporación de la mutación conforme al invento en el gen *gltA* dentro del cromosoma mediante un intercambio de alelos se puede utilizar un polinucleótido, que codifica una secuencia de aminoácidos, que contiene el intercambio de aminoácidos conforme al invento en la posición 5 de la SEQ ID NO:2, tal como se representa en la SEQ ID NO:10, y que posee corriente arriba y corriente abajo de ésta una secuencia de nucleótidos con una longitud de en cada caso por lo menos aproximadamente 51 (véanse también las SEQ ID NO:11 y 12), de manera preferida en cada caso por lo menos aproximadamente 101 o respectivamente 102, (véanse también las SEQ ID NO:13 y 14), de manera especialmente preferida en cada caso por lo menos aproximadamente 201 nucleobases (véanse también las SEQ ID NO:15 y 16) y de manera muy especialmente preferida en cada caso por lo menos aproximadamente 500 o respectivamente 498 nucleobases (véanse también las SEQ ID NO:17 y 18) escogidas a partir de la SEQ ID NO:9. La longitud máxima de la secuencia de nucleótidos situada corriente arriba y corriente abajo de la mutación se sitúa por lo general en aproximadamente 500, aproximadamente 750, aproximadamente 1.000, aproximadamente 1.500 o aproximadamente 2.000 hasta 2.100 nucleobases. La secuencia de nucleótidos situada corriente arriba de la mutación abarca, por ejemplo, la secuencia situada entre las posiciones 1 y 762 de la SEQ ID NO:9 o la secuencia situada entre las posiciones 1 y 1.012 de la SEQ ID NO:25. La secuencia de nucleótidos situada corriente abajo de la mutación abarca, por ejemplo, la secuencia situada entre las posiciones 766 y 2.814 de la SEQ ID NO:9, o la secuencia situada entre las posiciones 1.016 y 3.314 de la SEQ ID NO:25. La longitud total del polinucleótido empleado para el intercambio de alelos se sitúa de manera correspondiente en como máximo aproximadamente 1.000, como máximo aproximadamente 1.500, como máximo aproximadamente 2.000, como máximo aproximadamente 3.000 o como máximo aproximadamente 4.000 hasta 4.200 nucleobases.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- De manera correspondiente, es un objeto del invento un polinucleótido, que abarca una secuencia de nucleótidos, que desde la posición 1 hasta la 39 contiene la secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 1 hasta 39 de la SEQ ID NO:11, y desde la posición 40 hasta la 105 contiene una secuencia de nucleótidos, que codifica una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO:12, estando contenida L-valina en la posición 5.
- En este contexto, los datos sobre las posiciones 1 hasta 39 de la SEQ ID NO:11 corresponden a los datos sobre las posiciones 712 hasta 750 de la SEQ ID NO:9. Los datos sobre las posiciones 40 hasta 105 de las SEQ ID NO:11 corresponden a los datos sobre las posiciones 751 hasta 816 de la SEQ ID NO:9.
- En una forma preferida de realización, el polinucleótido abarca la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:11, realizándose que el codón correspondiente a las posiciones 52 hasta 54 codifica L-valina.
- En una forma de realización especialmente preferida, el polinucleótido abarca la secuencia de nucleótidos desde la posición 712 hasta la 816 de la SEQ ID NO:7.
- Correspondientemente, es un objeto del invento, además, un polinucleótido, que abarca una secuencia de nucleótidos, que desde la posición 1 hasta la 89 contiene la secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 1 hasta 89 de la SEQ ID NO:13 y desde la posición 90 hasta la 206 contiene una secuencia de nucleótidos, que codifica la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO:14, estando contenida L-valina en la posición 5.
- En este contexto, los datos sobre las posiciones 1 hasta 89 de la SEQ ID NO:13 corresponden a los datos sobre las posiciones 662 hasta 750 de la SEQ ID NO:9. Los datos sobre las posiciones 90 hasta 206 de la SEQ ID NO:13 corresponden a los datos sobre las posiciones 751 hasta 867 de la SEQ ID NO:9.
- En una forma preferida de realización, el polinucleótido abarca la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:13, realizándose que el codón correspondiente a las posiciones 102 hasta 104 codifica L-valina.
- En una forma de realización especialmente preferida, el polinucleótido abarca la secuencia de nucleótidos desde la posición 662 hasta la 867 de la SEQ ID NO:7.
- Un objeto del invento es de manera correspondiente, finalmente, un polinucleótido que abarca una secuencia de nucleótidos, que desde la posición 1 hasta la 189 contiene la secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 1 hasta 189 de la SEQ ID NO:15, y desde la posición 190 hasta la 405 contiene una secuencia de nucleótidos, que codifica la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO:16, estando contenida L-valina en la posición 5.
- En este contexto, los datos sobre las posiciones 1 hasta 189 de la SEQ ID NO:15 corresponden a los datos sobre las posiciones 562 hasta 750 de la SEQ ID NO:9. Los datos sobre las posiciones 190 hasta 405 de la SEQ ID NO:15 corresponden a los datos sobre las posiciones 751 hasta 966 de la SEQ ID NO:9.

En una forma preferida de realización, el polinucleótido abarca la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:15, realizándose que el codón correspondiente a las posiciones 202 hasta 204 codifica L-valina.

5 En una forma especialmente preferida de realización, el polinucleótido abarca la secuencia de nucleótidos desde la posición 562 hasta la 966 de la SEQ ID NO:7.

10 De manera correspondiente es objeto del invento, finalmente, también un polinucleótido que abarca una secuencia de nucleótidos, que desde la posición 1 hasta la 488 contiene la secuencia de nucleótidos 1 hasta 488 de la SEQ ID NO:17, y desde la posición 489 hasta la 1.001 contiene una secuencia de nucleótidos, que codifica la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO:18, estando contenida L-valina en la posición 5.

15 En este contexto, los datos sobre las posiciones 1 hasta 488 de la SEQ ID NO:17 corresponden a los datos sobre las posiciones 263 hasta 750 de la SEQ ID NO:9. Los datos sobre las posiciones 489 hasta 1.001 de la SEQ ID NO:15 corresponden a los datos sobre las posiciones 751 hasta 1.263 de la SEQ ID NO:9.

20 En una forma preferida de realización, el polinucleótido abarca la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:17, realizándose que el codón correspondiente a las posiciones 501 hasta 503 codifica L-valina.

25 En una forma especialmente preferida de realización, el polinucleótido abarca la secuencia de nucleótidos desde la posición 263 hasta la 1.263 de la SEQ ID NO:7.

30 En una forma muy especialmente preferida de realización, el polinucleótido abarca la secuencia de nucleótidos desde la posición 9 hasta la 1.687 de la SEQ ID NO:31.

35 Un objeto del invento son asimismo unos vectores, de manera preferida unos plásmidos, que contienen los polinucleótidos mencionados.

40 Un objeto del invento son asimismo unas bacterias, de manera preferida del género *Escherichia*, de manera especialmente preferida de la especie *Escherichia coli*, y del género *Corynebacterium*, de manera especialmente preferida de la especie *Corynebacterium glutamicum*, que contienen los mencionados vectores.

45 Un objeto del invento son asimismo unas cepas del género *Corynebacterium*, de manera preferida de la especie *Corynebacterium glutamicum*, que se habían producido mediando utilización de los polinucleótidos conformes al invento o mediando utilización de unos vectores, que contienen los polinucleótidos conformes al invento.

50 Asimismo, es posible incorporar el alelo *gltA* conforme al invento en otro lugar en el cromosoma de *Corynebacterium glutamicum*. En este caso, se puede tratar, por ejemplo, de los sitios o respectivamente genes *aecD*, *ccpA1*, *ccpA2*, *citA*, *citB*, *citE*, *fda*, *gluA*, *gluB*, *gluC*, *gluD*, *luxR*, *luxS*, *lysR1*, *lysR2*, *lysR3*, *menE*, *mqo*, *pck*, *pgi* y *poxB*, tal como se han descrito en el documento WO 03/04037. En este caso, se puede tratar, además, por ejemplo de unas regiones intergénicas, de un ADN de profagos, de fagos defectuosos y de componentes de fagos, tal como se han descrito en el documento WO 04/069996.

55 Las cepas recombinantes, obtenidas conforme al invento, muestran una segregación o respectivamente producción del aminoácido deseado en un proceso de fermentación, que ha sido aumentada en comparación con la cepa de partida empleada o respectivamente con la cepa parental.

60 Las cepas de partida que segregan L-lisina, que son empleables para las medidas técnicas del invento, poseen, junto a otras propiedades, en particular la de una aspartato cinasa insensible frente a la lisina.

65 Por el concepto de "una aspartato cinasa insensible frente a la lisina" se entiende un polipéptido o respectivamente una proteína con una actividad de aspartato cinasa (nº de EC 2.7.2.4) que, en comparación con la forma silvestre, tiene 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. Tales aspartato cinasas son designadas también como aspartato cinasas resistentes o respectivamente desensibilizadas frente a la retroalimentación (en inglés "feed back"). Las secuencias de nucleótidos que codifican estas aspartato cinasas o respectivamente estas variantes de aspartato cinasas desensibilizadas son designadas también como alelos *lysC^{FBR}*. En los bancos de datos públicos están disponibles informaciones sobre numerosos alelos *lysC^{FBR}*. Algunos autores designan al gen *lysC* también como gen *ask*.

70 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 el polipéptido codificado por este gen se representa en la SEQ ID NO:20. En la SEQ ID NO:21 se exponen además las secuencias de nucleótidos que están situadas corriente arriba del extremo 5' y corriente abajo del extremo 3' de la región codificadora. La SEQ ID NO:20 corresponde a la SEQ ID NO:22.

Las bacterias que segregan L-lisina, empleadas para las medidas técnicas del invento, disponen de manera preferida de un alelo *lysC*, que codifica una variante de la aspartato cinasa, que posee la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:20, conteniendo ésta uno o varios intercambios de aminoácidos, escogidos entre el conjunto que se compone de:

- 5 a) LysC A279T (intercambio de L-alanina en la posición 279 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO:20 por L-treonina; véanse el documento US 5.688.671 y los números de acceso E06825, E06826, E08178 y 174588 hasta 174597),
- 10 b) LysC A279V (intercambio de L-alanina en la posición 279 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO:20 por L-valina; véanse el documento de solicitud de patente japonesa JP 6-261766 y el número de acceso E08179),
- 15 c) LysC L297Q (intercambio de L-leucina en la posición 297 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO:20 por otro aminoácido proteinógeno, de manera preferida L-glutamina; véase el documento DE 102006026328).
- 20 d) LysC S301F (intercambio de L-serina en la posición 301 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO:20 por L-fenilalanina; véanse el documento US 6.844.176 y el número de acceso E08180),
- 25 e) LysC S301Y (intercambio de L-serina en la posición 301 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO:20 por L-tirosina, véanse la cita de Kalinowski y colaboradores (Molecular and General Genetics 224, 317-324 (1990)) y el número de acceso X57226),
- 30 f) LysC T308I (intercambio de L-treonina en la posición 308 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO:20 por L-soleucina; véanse el documento JP 6-261766 y el número de acceso E08181),
- 35 g) LysC T311I (intercambio de L-treonina en la posición 311 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO:20 por L-soleucina; véanse los documentos WO 00/63388 y US 6.893.848),
- 40 h) LysC S317A (intercambio de L-serina en la posición 317 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO:20 por L-alanina; véanse el documento US 5.688.671 y el número de acceso 174589),
- i) LysC R320G (intercambio de L-arginina en la posición 320 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO:20 por glicina; véanse la cita de Jetten y colaboradores (Applied Microbiology and Biotechnology 43, 76-82 (1995)) y el número de acceso L27125),
- 45 j) LysC G345D (intercambio de glicina en la posición 345 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO:20 por L-ácido aspártico; véanse la cita de Jetten y colaboradores (Applied Microbiology and Biotechnology 43, 76-82 (1995)) y el número de acceso L16848),
- 50 k) LysC T380I (intercambio de L-treonina en la posición 380 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO:20 por L-soleucina, véanse el documento WO 01/49854 y el número de acceso AX192358), y
- l) LysC S381F (intercambio de L-serina en la posición 381 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO:20 por L-fenilalanina; véase el documento EP 0435132).

Se prefieren muy especialmente unas cepas, cuyas variantes de aspartato cinasa contienen el intercambio de aminoácidos LysC T311I o uno o varios de los intercambios de aminoácidos, escogidos entre el conjunto que se compone de LysC A279T, LysC L297Q, LysC S317A, LysC T380I y LysC S381F.

55 Naturalmente, es posible asimismo llevar a cabo primeramente la incorporación de la mutación conforme al invento en el gen *gltA* del cromosoma de una bacteria del género *Corynebacterium*, y a continuación incorporar una o varias de la(s) mutación (mutaciones) deseada(s) en el gen *lysC* de la correspondiente cepa.

60 En otra forma de realización, las aspartato cinasas descritas se presentan sobreexpresadas en la *Corynebacterium*, que contiene el intercambio de aminoácidos conforme al invento en el gen *gltA*.

65 Por el concepto de "sobreexpresión" se entiende por lo general un aumento de la concentración o actividad intracelular de un ácido ribonucleico, de una proteína o de una enzima en comparación con la cepa de partida (cepa parental) o con la cepa de tipo silvestre. Por el concepto de "una cepa de partida (cepa parental)" se entiende la cepa, en la que se había llevado a cabo la medida técnica del invento que conduce a la sobreexpresión.

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

5 Un método ampliamente propagado para el aumento del número de copias consiste en que el correspondiente polinucleótido se incorpora en un vector, de manera preferida en un plásmido, que es replicado por una bacteria corineiforme. 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)).

10 Además, como vectores se pueden emplear transposones, elementos de inserción (elementos IS) o fagos. Tales sistemas genéticos se describen, por ejemplo, en los documentos de patentes US 4.822.738, US 5.804.414 y US 15 5.804.414. De igual manera, se puede utilizar el elemento IS ISaB1 descrito en el documento WO 92/02627 o el transposón Tn 45 del plásmido pXZ10142 (citado en "Handbook of *Corynebacterium glutamicum*" (Manual de *Corynebacterium glutamicum*) (coordinadores de edición: L. Eggeling y M. Bott)).

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 polinucleótido que interesa se introduce en el cromosoma de una bacteria corineiforme.

25 Tales procedimientos de amplificación se describen, por ejemplo, en los documentos WO 03/014330 ó WO 03/040373.

30 Otro método para la consecución de una sobreexpresión consiste en unir el correspondiente gen o respectivamente alelo en un modo funcional (en inglés "operably linked" es decir engarzado operativamente) con un promotor o respectivamente una casete de expresión. Unos promotores adecuados para *Corynebacterium glutamicum* se describen, por ejemplo, en la Fig. 1 del artículo recopilativo de Patek y colaboradores (*Journal of Biotechnology* 104(1-3), 311-323 (2003)). De igual manera se pueden emplear las variantes del promotor de dapA, por ejemplo el promotor A25, descritas por Vasicova y colaboradores (*Journal of Biotechnology* 181, 6188-6191 (1999)). Además, se puede utilizar el promotor de gap de *Corynebacterium glutamicum* (documento EP 06007373). Finalmente se pueden utilizar los promotores de 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 de Amann y Brosius (*Gene* 40(2-3), 183-190 (1985)). Un promotor de este tipo puede ser introducido, por ejemplo, corriente arriba del respectivo gen, típicamente a una distancia de aproximadamente 1 - 500 nucleobases desde el codón de inicio.

35 Mediante las medidas técnicas de sobreexpresión se aumenta la actividad o la concentración del correspondiente polipéptido por lo general por lo menos en un 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 % o 500 %, como máximo hasta en un 1.000 % o 2.000 %, referido a la actividad o concentración del polipéptido en la cepa antes de realizarse la medida técnica que conduce a la sobreexpresión.

40 En otra forma de realización adicional, las bacterias conformes al invento del género *Corynebacterium*, que contienen de manera preferida además un polinucleótido, que codifica una variante de la aspartato cinasa insensible para lisina, poseen una o varias características, escogidas entre el conjunto que se compone de

- 45 a) un polinucleótido sobreexpresado (el gen dapA), que codifica una dihidropicolinato sintasa, (DapA, n° de EC 4.2.1.52)
- 50 b) un polinucleótido sobreexpresado (el gen asd), que codifica una aspartatosemialdehído deshidrogenasa (Asd, n° de EC 1.2.1.11),
- 55 c) un polinucleótido sobreexpresado (el gen lysA), que codifica una diaminopimelato descarboxilasa (LysA, n° de EC 4.1.1.20),
- 60 d) un polinucleótido sobreexpresado (el gen aat), que codifica una asparato aminotransferasa (Aat, n° de EC 2.6.1.1),
- 65 e) un polinucleótido sobreexpresado (el gen lysE), que codifica un polipéptido con una actividad de exportación de L-lisina (LysE, permeasa de eflujo de lisina),
- f) una actividad desconectada o debilitada de la malato deshidrogenasa (Mdh, n° de EC 1.1.1.37),
- g) una actividad desconectada o debilitada de la malato quinona oxidoreductasa (Mqo, n° de EC 1.1.99.16),

- h) un polinucleótido sobreexpresado, que codifica una piruvato carboxilasa (Pyc, n° de EC 6.4.1.1), y
 i) una actividad desconectada o debilitada de la subunidad E1p del complejo de la piruvato deshidrogenasa (AceE, n° de EC 1.2.4.1).

5 Las características a) hasta g) son especialmente preferidas.

Para realizar la sobreexpresión de los genes o respectivamente polinucleótidos expuestos, se pueden utilizar los genes conocidos dentro del estado de la técnica, por ejemplo, los denominados genes de tipo silvestre de *Escherichia coli* (Blattner y colaboradores, *Science* 277(5), 1453-1462 (1997)), de *Bacillus subtilis* (Kunst y colaboradores, *Nature* 390 (6657), 249-256 (1997)), de *Bacillus licheniformis* (Veith y colaboradores, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 7 (4), 204-211 (2004)), de *Mycobacterium tuberculosis* (Fleischmann y colaboradores, *Journal of Bacteriology* 1841, 5479-5490 (2004)), de *Mycobacterium bovis* (Garnier y colaboradores, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 100 (13), 7877-7882 (2003)), de *Streptomyces coelicolor* (Redenbach y colaboradores, *Molecular Microbiology* 21 (1), 77-96 (1996)), de *Lactobacillus acidophilus* (Altermann y colaboradores, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 102 (11), 3906-3912 (2005)), de *Lactobacillus johnsonii* (Pridmore y colaboradores, *Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.* 101 (8), 2512-2517 (2004)), de *Bifidobacterium longum* (Schell y colaboradores, *Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.* 99 (22), 14422-14427 (2002)), y de *Saccharomyces cerevisiae*. Los genomas de las formas de tipo silvestre de estas bacterias se presentan en una forma secuenciada y anotada. De manera preferida, se utilizan los genes o respectivamente polinucleótidos endógenos del género *Corynebacterium*, de manera especialmente preferida de la especie *Corynebacterium glutamicum*.

25 Por el concepto de "genes o respectivamente polinucleótidos endógenos" se entienden los marcos de lectura abiertos (ORF), los genes o alelos o respectivamente sus polinucleótidos, que están presentes en la población de una especie.

30 El gen *dapA* de *Corynebacterium glutamicum* cepa ATCC13032 se describe, por ejemplo, en el documento EP 0.197.335. Para la sobreexpresión del gen *dapA* de *Corynebacterium glutamicum* se pueden emplear además, entre otras, las mutaciones MC20 y MA16 del promotor de *dapA*, tal como se han descrito en el documento US 6.861.246.

35 El gen *asd* de *Corynebacterium glutamicum* cepa ATCC21529 se ha descrito, por ejemplo, en el documento US 6.927.046.

40 El gen *lysA* de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 (*Brevibacterium lactofermentum*) se ha descrito, por ejemplo, en el documento US 6.090.597.

45 El gen *aat* de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 se ha descrito, por ejemplo, en la cita de Kalinowski y colaboradores (*Journal of Biotechnology* 104 (1-3), 5-25 (2003); véase también el número de acceso NC_006958). Allí, él es designado como gen *aspC*. En el documento US 6.004.773, un gen que codifica una aspartato aminotransferasa es designado como gen *aspB*. Marienhagen y colaboradores (*Journal of Bacteriology* 187 (22), 7639-7646 (2005) designan al gen *aat* como gen *aspT*.

50 El gen *lysE* de *Corynebacterium glutamicum* R127 se ha descrito, por ejemplo en el documento US 6.858.406. En el caso de la cepa R127 se trata de un mutante con defecto de restricción de ATCC13032 (Liebl y colaboradores, *FEMS Microbiology Letters* 65, 299-304 (1989)). De igual manera, se puede emplear el gen *lysE* de la cepa ATCC13032 utilizado en el documento US 6.861.246.

55 El gen *pyc* de *Corynebacterium glutamicum* de la cepa ATCC 13032 se ha descrito, por ejemplo, en los documentos WO 99/18228 y WO 00/39305. Además, se pueden utilizar unos alelos del gen *pyc* tal como se han descrito, por ejemplo, en el documento US 6.965.021. Las piruvato carboxilasas descritas en este documento de patente poseen uno o varios de los intercambios de aminoácidos, escogidos entre el conjunto que se compone de: Pyc E153D (intercambio de L-ácido glutámico en la posición 153 por L-ácido aspártico), Pyc A182S (intercambio de L-alanina en la posición 182 por L-serina), Pyc A206S (intercambio de L-alanina en la posición 206 por L-serina), Pyc H227R (intercambio de L-histidina en la posición 227 por L-arginina), Pyc A455G (intercambio de L-alanina en la posición 455 por glicina) y Pyc D1120E (intercambio de L-ácido aspártico en la posición 1.120 por L-ácido glutámico). De igual manera se puede utilizar el alelo *pyc* descrito en el documento EP 1.108.790, que codifica una piruvato carboxilasa, que contiene el intercambio de aminoácidos Pyc P458S (intercambio de L-prolina en la posición 458 por L-serina).

60 Por el concepto de "una actividad desconectada o debilitada" se entiende la disminución o la desconexión de la actividad o concentración intracelular de una o varias enzimas o respectivamente proteínas en un microorganismo, que es (son) codificada(s) por el correspondiente polinucleótido o respectivamente ADN.

65 Para la producción de una cepa, en la que se ha desconectado la actividad intracelular de un polipéptido deseado, se incorpora una supresión o inserción de por lo menos una (1) nucleobase, de manera preferida de una (1) o de

dos (2) nucleobases, en la región codificadora del correspondiente gen. Igualmente es posible suprimir un (1) o también varios codón (codones) dentro de la región codificadora. Estas medidas técnicas conducen a un desplazamiento del marco de lectura (en inglés "frame shift mutations"), y por consiguiente típicamente a la síntesis de un polipéptido incapaz de funcionar. De igual manera actúa la introducción de un mutación sin sentido (en inglés "nonsense mutation") por transversión o transición de por lo menos una (1) nucleobase dentro de la región codificadora. A causa del codón de interrupción resultante, se llega a una interrupción prematura de la traducción. Las medidas técnicas mencionadas se llevan a cabo de manera preferida en la región situada entre el codón de inicio y el penúltimo codón codificador, de manera especialmente preferida en la parte del terminal 5' de la región codificadora, que codifica el terminal de N del polipéptido. Si se designa a la longitud total de un polipéptido (medida como el número de los L-aminoácidos unidos por medios químicos) con 100 %, entonces - dentro del marco del presente invento – al extremo terminal de N del polipéptido pertenece la parte de la secuencia de aminoácidos que, calculada a partir del aminoácido inicial L-formil-metionina, contiene un 80 % de los siguientes L-aminoácidos.,

Unas medidas genéticas para realizar la desconexión de la malato quinona oxidoreductasa (Mqo) se han descrito, por ejemplo, en el documento US 7.094.106.

Unas medidas genéticas para realizar la desconexión de la malato deshidrogenasa (Mdh) se han descrito, por ejemplo, en el documento WO 02/02778.

Unas medidas genéticas para realizar la desconexión de la subunidad E1p (AceE) del complejo de la piruvato deshidrogenasa se han descrito, por ejemplo, en el documento EP 06119615 y en la cita de Schreiner y colaboradores (Journal of Bacteriology 187(17), 6005-6018 (2005)).

Asimismo, mediante adecuados intercambios de aminoácidos es posible disminuir la propiedad catalítica del correspondiente polipéptido.

En el caso de la malato quinona oxidoreductasa (Mqo), esto se puede conseguir, tal como se ha descrito en el documento WO 06/077004, produciendo o respectivamente utilizando unos alelos del gen mqo, que codifican una variante de Mqo, que posee la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:24 y uno o varios intercambios de aminoácidos escogidos entre el conjunto que se compone de

a) el intercambio de la L-serina en la posición 111 por otro aminoácido proteinógeno, de manera preferida por L-fenilalanina o L-alanina, y

b) el intercambio de la L-alanina en la posición 201 por otro aminoácido proteinógeno, de manera preferida por L-serina.

Se prefieren muy especialmente unas cepas que contienen un alelo mqo, que codifica una variante de la Mqo, que posee la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:24, estando contenida L-fenilalanina en la posición 111.

Mediante las medidas técnicas de la desconexión o del debilitamiento, se disminuye la actividad o concentración de la correspondiente proteína por lo general en 0 hasta 75 %, en 0 hasta 50 %, en 0 hasta 25%, en 0 hasta 10 % o en 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 la cepa de partida o respectivamente en la cepa parental.

El rendimiento de las bacterias producidas conforme al invento del género *Corynebacterium* 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 de un L-aminoácido (L-aminoácido formado por volumen), del rendimiento de un L-aminoácido (L-aminoácido formado por fuente de carbono consumida), de la formación de un L-aminoácido (L-aminoácido formado por volumen y tiempo) y de la formación específica de un L-aminoácido (L-aminoácido formado por masa celular seca o respectivamente biomasa seca y tiempo, o L-aminoácido formado por proteína celular y tiempo) o también otros parámetros de procesos y otras combinaciones de éstos, se aumenta en por lo menos 0,5 %, por lo menos 1 %, por lo menos 1,5 % o por lo menos 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 del género *Corynebacterium*, producidas conforme 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 los L-aminoácidos deseados. Una recopilación de tipo general acerca de métodos conocidos de cultivación se describe en el libro de texto de Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik [Técnica de bioprocessos 1. Introducción en la técnica de los bioprocessos] (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 o respectivamente medio de fermentación 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 y 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 palmitíco, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes, tales como por ejemplo glicerol, metanol y etanol, y ácidos orgánicos, tales como por ejemplo ácido acético o ácido láctico. 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 hormonas del crecimiento o fitohormonas esenciales, tales como aminoácidos, por ejemplo homoserina, y vitaminas, por ejemplo tiamina, biotina o ácido pantoténico.

Las mencionadas sustancias de partida empleadas 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, amónico 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 incorporan 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 una 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 del L-aminoácido deseado. 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. Debido a la actividad de las bacterias se llega a un enriquecimiento (una acumulación) del L-aminoácido en el medio de fermentación y/o en las células de las bacterias.

Ejemplos de adecuados medios de fermentación se encuentran, entre otros lugares, en los documentos US 5.770.409, US 5.840.551 y US 5.990.350 o 5.275.940.

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: 1167-1174).

Un objeto del invento es, como consecuencia de esto, también un procedimiento para la producción de un L-aminoácido caracterizado porque, se llevan a cabo las siguientes etapas:

a) fermentación de las bacterias conformes al invento en un medio nutritivo adecuado,

b) acumulación del L-aminoácido en el medio nutritivo o en las células de las mencionadas bacterias.

A esto le sigue por lo general la recogida (en inglés "collecting") del L-aminoácido acumulado en el medio nutritivo o respectivamente en el caldo de fermentación o en las células de las bacterias, con el fin de acceder a un producto sólido o líquido.

5 Por el concepto de "un caldo de fermentación" se entiende un medio de fermentación o respectivamente un medio nutritivo, en el que se había cultivado un microorganismo durante un cierto período de tiempo y a una determinada temperatura. El medio de fermentación o respectivamente los medios empleados durante la fermentación contiene(n) todas las sustancias o respectivamente los componentes, que aseguran una multiplicación del microorganismo y una formación del aminoácido deseado.

10 Al finalizar la fermentación, el caldo de fermentación resultante contiene de modo correspondiente: a) la biomasa (masa celular) del microorganismo, que ha resultado como consecuencia de la multiplicación de las células del microorganismo, b) el L-aminoácido deseado, que se ha formado en el transcurso de la fermentación, tal como L-lisina, L-valina o L-isoleucina, c) los productos secundarios orgánicos, formados en el transcurso de la fermentación, 15 y d) los componentes, que no se han consumido por la fermentación, del medio de fermentación empleado o respectivamente de las sustancias de partida empleadas, tales como, por ejemplo, vitaminas tales como biotina, aminoácidos tales como homoserina, o sales tales como sulfato de magnesio.

20 A los productos secundarios orgánicos pertenecen unas sustancias, que son producidas por los microorganismos empleados al realizar la fermentación eventualmente junto al respectivo compuesto químico orgánico, y que son segregadas eventualmente. A éstas pertenecen también azúcares tales como, por ejemplo, trehalosa.

25 En el caso de los aminoácidos L-valina y L-isoleucina se prefieren un aislamiento y una purificación, por ejemplo mediando utilización de uno o varios procedimientos, escogidos entre el conjunto que se compone de procedimientos cromatográficos, procedimientos de cristalización y utilización de carbón activo, de tal manera que se obtengan unos productos ampliamente puros, por ejemplo unos que tienen una pureza de $\geq 90\%$ en peso o de $\geq 95\%$ en peso.

30 En el caso del aminoácido L-lisina, dentro del estado de la técnica se conocen en lo esencial cuatro diferentes formas del producto.

35 Un conjunto de productos que contienen L-lisina, abarca unas soluciones alcalinas acuosas concentradas de una L-lisina purificada (documento de patente europea EP-B-0534865). Otro conjunto adicional, tal como el que se ha descrito por ejemplo en los documentos US 6.340.486 y US 6.465.025, abarca unos concentrados acuosos, ácidos, que contienen una biomasa, de caldos de fermentación que contienen L-lisina. El conjunto más conocido de 40 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 monohidrocloruro 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, utilizadas durante la producción por fermentación y no consumidas, y eventualmente la biomasa del microorganismo empleado con una proporción de $> 0\% - 100\%$.

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

50 Para la producción de una L-lisina pura, sólida, se usan en lo esencial los métodos de la cromatografía con intercambio de iones eventualmente mediando utilización de carbón activo y los métodos de cristalización. De esta manera se obtiene la correspondiente base o una correspondiente sal, tal como, por ejemplo, el monohidrocloruro de lisina (Lys-HCl) o el sulfato de lisina (Lys₂-H₂SO₄).

55 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 del procedimiento allí descrito, la biomasa procedente del caldo de fermentación se separa y desechara. 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 (las 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.

60 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 algunos componentes del caldo de fermentación. Éstos se utilizan en particular como aditivos para piensos de animales.

65 Según sea el requisito, la biomasa se puede eliminar total o parcialmente a partir del caldo de fermentación, mediante unos 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.

5 En un modo de procedimiento, la biomasa se elimina totalmente o casi totalmente, de tal manera que en el producto producido no permanezca nada (0 %) o a lo sumo permanezca 30 %, a lo sumo 20 %, a lo sumo 10 %, a lo sumo 5 %, a lo sumo 1 % o a lo sumo 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 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 99,9 % de la biomasa permanezca en el producto producido. En un procedimiento conforme al invento, se elimina de modo correspondiente la biomasa en unas proporciones de $\geq 0\%$ hasta $\leq 100\%$.

10 Finalmente, el caldo de fermentación obtenido después de la fermentación, antes o después de la eliminación total o parcial de la biomasa, se puede ajustar a un valor ácido del pH 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). Igualmente, es posible acidificar el caldo de fermentación con la biomasa que está contenida completamente. Finalmente, el caldo se puede estabilizar también mediante una adición de bisulfito de sodio (NaHSO_3 , documento 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.

20 Al realizar la separación de la biomasa, se eliminan eventualmente de manera parcial o total los materiales sólidos orgánicos o inorgánicos contenidos en la biomasa. Los productos secundarios orgánicos disueltos en el caldo de fermentación, y los componentes disueltos, que no se han consumido, del medio de fermentación (es decir, las sustancias de partida 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, éstos permanecen en el producto también totalmente (en un 100 %) o casi totalmente, es decir en $> 95\%$ o en $> 98\%$ o en más que 99 %. Si un producto, en este sentido, contiene por lo menos una parte de los componentes del caldo de fermentación, esto se parafrasea también con el concepto de "producto constituido sobre la base del caldo de fermentación".

30 A continuación, al caldo se le substraen el agua con métodos conocidos, tal como p.ej. con ayuda de un evaporador rotatorio, de un evaporador de capa fina, de un evaporador de película descendente, mediante una ósmosis inversa o mediante una nanofiltración, o respectivamente éste es espesado o concentrado. Este caldo de fermentación concentrado se puede elaborar a continuación mediante métodos de la liofilización, de la desecación por atomización, de la granulación por atomización o mediante procedimientos de otros tipos, tal como, por ejemplo, en una capa fluidizada circulante, según 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 grano grueso. Eventualmente, a partir del granulado obtenido mediante un tamizado o una separación del polvo se puede aislar un producto deseado.

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

Por el concepto de "capaz de corrimiento" se entienden unos polvos que salen sin obstáculos desde una serie de recipientes de salida de vidrio, 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)).

45 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 .

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

55 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 a la tecnología de partículas] de M. Rhodes, editorial Wiley & Sons (1998)).

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

65 El concepto de "exento de polvo" significa, que el producto contiene solamente unas pequeñas proporciones ($< 5\%$) de unos tamaños de granos con diámetros situados 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 (como máximo 5 %) del respectivo aminoácido.

5 Otro objeto adicional del invento es un procedimiento, que se ha descrito en cuanto a sus trazos fundamentales en el documento DE 102006016158, y en el que el caldo de fermentación, obtenido mediando utilización de los microorganismos conformes al invento, a partir del que se había separado la biomasa eventualmente de manera total o parcial, se sigue elaborando, mediante el recurso de que se lleva a cabo un procedimiento que abarca por lo 10 menos las siguientes etapas:

15 a) se disminuye el valor del pH, mediante una adición de ácido sulfúrico, a 4,0 hasta 5,2, en particular a 4,9 hasta 5,1, y se ajusta una relación molar de sulfato/L-lisina de 0,85 a 1,2, de manera preferida de 0,9 a 1,0, de manera especialmente preferida de > 0,9 a < 0,95 en el caldo, eventualmente mediante adición de otro o de varios otros compuesto(s), que contiene(n) sulfato

17 b) la mezcla así obtenida se concentra mediante substracción de agua, y eventualmente se granula,

20 llevándose a cabo eventualmente antes de la etapa a) una o dos de las siguiente(s) medida(s) técnica(s):

25 c) medición de la relación molar de sulfato/L-lisina para la determinación de la cantidad requerida de compuesto(s), que contiene(n) sulfato,
d) adición de un compuesto que contiene sulfato, escogido entre el conjunto que se compone de sulfato de amonio, hidrógeno-sulfato de amonio y ácido sulfúrico en unas correspondientes relaciones.

30 Eventualmente, además, antes de la etapa b) se añade además una sal del ácido sulfuroso, de manera preferida un hidrógeno-sulfito de un metal alcalino, de manera especialmente preferida un hidrógeno-sulfito de sodio en una concentración de 0,01 a 0,5 % en peso, de manera preferida de 0,1 a 0,3 % en peso, de manera especialmente preferida de 0,1 a 0,2 % en peso, referida al caldo de fermentación.

35 Como compuestos que contienen sulfato, preferidos dentro del sentido de las etapas de procedimiento más arriba mencionadas, se han de mencionar en particular sulfato de amonio y/o hidrógeno-sulfato de amonio o unas correspondientes mezclas de amoníaco y ácido sulfúrico y el ácido sulfúrico propiamente dicho.

40 La relación molar de sulfato/L-lisina V se calcula según la fórmula: $V = 2 \times [\text{SO}_4^{2-}] / [\text{L-lisina}]$. Esta fórmula toma en cuenta el hecho de que el anión de SO_4^{2-} , o respectivamente el ácido sulfúrico, es bivalente. Una relación $V = 1$ significa que se presenta una $\text{Lys}_2\text{-H}_2\text{SO}_4$ compuesta estequiométricamente, mientras que en el caso de una relación $V = 0,9$ se encuentra una deficiencia de sulfato de un 10 %, y en el de una relación de $V = 1,1$ se encuentra un exceso de sulfato de un 10 %.

45 Al realizar la granulación o compactación es ventajoso el empleo de unas usuales sustancias auxiliares 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.

50 Además, es ventajoso tratar con unos 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 o mezclas de aceite de soja y de lecitina. De igual manera, también se adecuan aceites de siliconas, poli(etylenglicoles) o una hidroxietil-celulosa. Mediante el tratamiento de las superficies con los aceites mencionados, se consiguen 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.

55 Se prefieren unos productos con una proporción $d \geq 97$ % en peso con un tamaño de granos con unos diámetros de 100 a 1.800 μm o con una proporción $d \geq 95$ % 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 μm , se sitúa de manera preferida en > 0 a 1 % en peso, - de manera especialmente preferida en como máximo 0,5 % en peso -.

60 Alternativamente, el producto se puede extender también sobre un material de soporte o vehículo orgánico o inorgánico, que es conocido y usual 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 uso y los procedimientos para esto se describen en la bibliografía (Die Mühle + Mischfuttertechnik (El molino + la técnica de piensos mixtos) 132 (1995) 49, página 817).

Finalmente, el producto, también, mediante unos procedimientos de revestimiento (en inglés "coating") con unos agentes formadores de películas tales como por ejemplo carbonatos metálicos, ácidos silílicos, silicatos, alginatos, esteearatos, almidones, gomas y éteres de celulosa, tal como se han descrito en el documento de patente alemana 5 DE-C-4100920, se puede llevar a un estado, en el que él es estable frente a la digestión por estómagos de animales, en particular por el estómago de rumiantes.

Para el ajuste de una concentración deseada de L-lisina en el producto, según sea el requisito, la L-lisina se puede añadir durante el procedimiento en forma de un concentrado o eventualmente de una sustancia ampliamente pura o 10 respectivamente de una de sus sales, en una forma líquida o sólida. Éste y ésta se pueden añadir individualmente o como unas mezclas al caldo de fermentación obtenido o concentrado, o también durante el proceso de desecación o granulación.

15 Otro objeto del invento es un procedimiento para la producción de un producto sólido que contiene lisina, tal como el que se ha descrito en sus rasgos fundamentales en el documento de solicitud de patente de los EE.UU, US 20050220933, y que comprende la elaboración del caldo de fermentación obtenido mediando utilización de los microorganismos conformes al invento, en las siguientes etapas:

- 20 a) filtración del caldo de fermentación, de manera preferida con un filtro de membrana, de tal manera que se obtengan un lodo que contiene una biomasa, y un material filtrado,
- 25 b) aumento de la concentración del material filtrado, preferiblemente de tal manera que se obtenga un contenido de materiales sólidos de 48 a 52 % en peso,
- 30 c) granulación del concentrado obtenido en la etapa b), de manera preferida a una temperatura de 50°C a 62°C, y
- 35 d) revestimiento del granulado obtenido en c) con uno o varios de los agentes de revestimiento (en inglés "coating agent(s)").

30 Para el revestimiento en la etapa d) se utilizan de manera preferida unos agentes de revestimiento, escogidos entre el conjunto que se compone de

- 35 d1) la biomasa obtenida en la etapa a),
- 40 d2) un compuesto que contiene L-lisina, de manera preferida escogido entre el conjunto que se compone de hidrocloruro de L-lisina o sulfato de L-lisina,
- 45 d3) una sustancia exenta esencialmente de L-lisina con un contenido de L-lisina < 1 % en peso, de manera preferida < 0,5 % en peso, de manera preferida escogida entre el conjunto que se compone de un almidón, un carragenano, un agar, ácidos silílicos, silicatos, materiales molidos, salvados y harinas, y
- 50 d4) una sustancia repelente del agua, que se escoge de manera preferida entre el conjunto que se compone de aceites, poli(etylenglicoles) y parafinas líquidas.

45 Mediante las medidas técnicas correspondientes a las etapas d1) hasta d4), en particular d1) hasta d3), el contenido de L-lisina se ajusta a un valor deseado.

50 En el caso de la producción de unos productos que contienen L-lisina, la relación de los iones se ajusta preferentemente de tal manera, que la relación molar de iones, se establezca de modo correspondiente a la siguiente fórmula $2 \times [\text{SO}_4^{2-}] + [\text{Cl}^-] - [\text{NH}_4^+] - [\text{Na}^+] - [\text{K}^+] - 2 \times [\text{Mg}^{2+}] - 2 \times [\text{Ca}^{2+}] / [\text{L-Lys}]$ como de 0,68 a 0,95, de manera preferida de 0,68 a 0,90, tal como ha sido descrito por Kushiki y colaboradores en el documento US 20030152633.

55 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 (en forma de 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.

60 El contenido de agua del producto sólido, que contiene L-lisina, 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.

Ejemplo 1

65 Secuenciación del gen *gltA* de la cepa DM678

5 La cepa de *Corynebacterium glutamicum* DM678 (documento US 6.861.246) es una cepa de producción de lisina, que había sido desarrollada mediante mutagénesis y escrutinio. Ella es auxótrofa para L-treonina y sensible a L-metionina. La cepa fue presentada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Alemania) como DSM12866.

10 A partir de la cepa DM678 se aisló un ADN cromosomal con el método de Eikmanns y colaboradores (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)). Con ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa se amplificó un segmento de ADN, que llevaba el gen *gltA*. Para esto se utilizaron como cebadores los siguientes oligonucleótidos:

15 *gltA_XL-A1* (SEQ ID NO: 27):
5' tgagttctattggcgtgacc 3'

20 *gltA_XL-E1* (SEQ ID NO: 28):
5' ttgcccaacgatgatgtcag 3'

25 Los cebadores expuestos fueron sintetizados por la entidad MWG Biotech (Ebersberg, Alemania). Ellos hacen posible la amplificación de un segmento de ADN con una longitud de aproximadamente 1,8 kb (kilobases), que lleva el gen *gltA*. El cebador *gltA_XL-A1* se fija a la región que corresponde a las posiciones 490 hasta 509 de la cadena complementaria a la SEQ ID NO: 3 (y a la SEQ ID NO:7). El cebador *gltA-XL-E1* se fija a la región que corresponde a las posiciones 2.266 hasta 2.247 de la cadena de acuerdo con la SEQ ID NO: 3 (y la SEQ ID NO:7).

30 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, en el caso de un volumen total de 50 μ l, 10 μ l del tampón 5 x Phusion HF suministrado conjuntamente, desoxinucleósido-trifosfatos en una concentración de en cada caso 200 μ M, cebadores en una concentración de 0,5 μ M, aproximadamente 50 ng de un ADN de molde y 2 unidades de la polimerasa Phusion. Mediante adición de H₂O se ajustó el volumen a 50 μ l.

35 La tanda de PCR se sometió en primer lugar a una desnaturación introductoria a 98°C durante 30 segundos. Después de esto, repitiéndose 35x (veces), siguieron una etapa de desnaturación a 98°C durante 20 segundos, una etapa para la fijación de los cebadores al ADN dispuesto previamente a 60°C durante 20 segundos y la etapa de extensión para la prolongación de los cebadores a 72°C durante 60 segundos. Después de la etapa de extensión final durante 5 minutos a 72°C, la tanda de PCR se sometió a una electroforesis en gel de agarosa (con 0,8 % de agarosa). Un fragmento de ADN con una longitud de aproximadamente 1,8 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).

40 La secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN amplificado o respectivamente del producto de la PCR fue determinada por la entidad Agowa (Berlín, Alemania).

45 La secuencia de nucleótidos de la región codificadora del alelo *gltA* de la cepa DM678 contiene en la posición 14 la nucleobase timina. El gen del tipo silvestre (véase la SEQ ID NO: 1) contiene en esta posición la nucleobase adenina. Esta transversión de adenina-timina conduce a un intercambio de aminoácidos, de aspartato por valina, en la posición 5 de la resultante secuencia de aminoácidos. Esta mutación se designa en lo sucesivo como *gltAD5V*. El alelo *gltAD5V* se representa en la SEQ ID NO:5, la secuencia de aminoácidos de la proteína, que se establece con ayuda del programa PatentIn, se representa en la SEQ ID NO:6.

Ejemplo 2

50 Construcción del vector de intercambio pk18mobsacB_*gltAD5V*

55 Con ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa se amplificó un fragmento de ADN, que contiene una parte de la "región corriente arriba" del gen *gltA* así como una parte de la región codificadora, que contiene la mutación *gltAD5V*. Como molde se utilizó el ADN cromosomal de DM678 obtenido en el Ejemplo 1. Como cebadores para la PCR se escogieron los siguientes oligonucleótidos:

60 *gltA_1.p* (SEQ ID NO: 29):
5' CCGTCGACAATAGCCTGAA 3'

gltA_2.p (SEQ ID NO: 30):
5' CC-GAATTC-TTCGAGCATCTCCAGAAC 3'

65 Ellos fueron sintetizados por la entidad MWG Biotech (Ebersberg, Alemania) y hacen posible la amplificación de un segmento de ADN con una longitud de aproximadamente 1,7 kb (kilobases), que contiene 832 pb de la región corriente arriba y los nucleótidos 1-855 pb del gen *gltA* procedente de DM678.

El cebador gltA_1.p se fija a la región que corresponde a las posiciones 169 hasta 187 de la cadena complementaria a la SEQ ID NO:25. Los nucleótidos 9 hasta 26 del cebador gltA_2.p se fijan a la región que corresponde a las posiciones 1.855 hasta 1.838 de la cadena de acuerdo con la SEQ ID NO:25. Además, el cebador gltA_1.p contiene el sitio de corte natural de la enzima de restricción Sall y el cebador gltA_2.p contiene la secuencia del sitio de corte de la enzima de restricción EcoRI, que están marcados por subrayado en la secuencia de nucleótidos arriba representada.

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 descrita. La PCR se llevó a cabo tal como se ha indicado más arriba. La secuencia de nucleótidos del material amplificado con una longitud de aproximadamente 1,7 kb se representa en la SEQ ID NO:31.

El material amplificado se trató con las endonucleasas de restricción Sall y EcoRI y se identificó mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 %. A continuación, él fue aislado a partir del gel y purificado con el estuche QIAquick Gel Extraction Kit de la entidad Qiagen.

El fragmento de ADN purificado de esta manera contiene la mutación gltAD5V descrita y posee unos extremos compatibles con un ADN cortado con Sall o respectivamente con EcoRI (el fragmento gltAD5V o respectivamente gltA en la Figura 1). A continuación, él fue clonado en el vector pK18mobsacB movilizable, que ha sido 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 las enzimas de restricción EcoRI y Sall, 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 gltAD5V 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 del plásmido se efectuó por siembra en placas de la tanda de transformación sobre un agar LB (Sambrook y colaboradores, Molecular Cloning: a laboratory manual, 2^a 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 una disociación por restricción con las enzimas Sall y EcoRI y una subsiguiente electroforesis en gel de agarosa. El plásmido fue denominado pK18mobsacB_gltAD5V y se ha representado en la Figura 1.

Ejemplo 3

Incorporación de la mutación gltAD5V en la cepa *Corynebacterium glutamicum* DM1797

La mutación gltAD5V debe de ser incorporada en la cepa *Corynebacterium glutamicum* DM1797. La cepa DM1797 es un mutante resistente a aminoetil-cisteína de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 y se describe en el documento PCT/EP/2005/012417. Ella ha sido presentada bajo la denominación DSM16833 en la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Alemania).

El vector pK18mobsacB_gltAD5V descrito en el Ejemplo 2 fue transferido por conjugación a la cepa DM1797 de *C. glutamicum* de acuerdo con el protocolo de Schäfer y colaboradores (Journal of Microbiology 172: 1663-1666 (1990)). El vector no se puede replicar de manera autónoma en DM1797 y permanece conservado en la célula solamente cuando él se presenta integrado en el cromosoma como consecuencia de un suceso de recombinación. La selección de unos transconjugantes, es decir de unos clones con el pK18mobsacB_gltAD5V 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 a la kanamicina fueron extendidos como un frote a continuación sobre placas de un agar LB suplementado con kanamicina (25 mg/l), y fueron incubados durante 24 horas a 33°C. Para realizar la selección de mutantes, en los que, como consecuencia de un segundo suceso de recombinación, había tenido lugar la escisión 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 un agar LB, que había sido suplementado con sacarosa al 10 % y fueron incubados durante 24 horas a 33°C.

El plásmido pK18mobsacB_gltAD5V, al igual que el plásmido de partida pK18mobsacB, contiene, junto al gen de resistencia a kanamicina, una copia del gen *sacB* que codifica la levano sucrasa de *Bacillus subtilis*. La expresión del gen *sacB*, que es inducible por sacarosa, conduce a la formación de la levano sucrasa, 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_gltAD5V integrado había sido escindido como consecuencia de un segundo suceso de recombinación. En dependencia de la situación del segundo suceso de recombinación en lo que respecta al sitio de la mutación, tiene lugar en el caso de la escisión el intercambio de

alelos o respectivamente la incorporación de la mutación, o la copia original permanece en el cromosoma del anfitrión.

A continuación se buscó un clon, en el que se había efectuado el intercambio deseado, es decir la incorporación de la mutación *gltAD5V*. Para esto, a partir de 10 clones con el fenotipo "crecimiento en presencia de sacarosa" y "ausencia de crecimiento en presencia de kanamicina", se determinó la secuencia del gen *gltA*. De esta manera se identificó un clon, que lleva la mutación *gltAD5V*. Esta cepa fue denominada como *C. glutamicum* DM1797_ *gltAD5V*.

10 Ejemplo 4

Producción de L-lisina

15 La cepa DM1797_ *gltAD5V* obtenida en el Ejemplo 3 y la cepa de partida DM1797 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.

20 Para esto, los clones se multiplicaron primeramente sobre unas placas de agar de corazón y cerebro (de Merck, Darmstadt, Alemania) durante 24 horas a 33°C. Partiendo de estos cultivos sobre 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. Los cultivos previos se incubaron durante 24 horas a 33°C y 240 rpm sobre un dispositivo sacudidor. A partir de estos cultivos previos se inoculó en cada caso un cultivo principal, de tal manera que la DO (densidad óptica) inicial (a 660 nm) del cultivo principal fuese de 0,1 DO. Para los cultivos principales se utilizó asimismo el medio MM.

25 Medio MM

CSL	5 g/l
MOPS	20 g/l
glucosa (autoclavada por separado)	50 g/l

30 Sales:

(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
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

40 El CSL (acrónimo de Corn Steep Liquor = líquido de maceración de maíz), el MOPS (ácido morfolinopropanosulfónico) y la solución de sales se ajustaron a un pH de 7 con agua amoniacal y se autoclavarón. A continuación se añadieron las soluciones estériles de substrato y de vitaminas así como el CaCO₃ autoclavado en seco.

45 La cultivación se efectuó en unos 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 %.

50 Después de 48 horas se determinó la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de medición de 660 nm con el instrumento Biomek 1000 (de Beckmann Instruments GmbH, Munich). La cantidad de lisina formada se determinó con un dispositivo 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.

55

Tabla 1

Cepa	DO (660)	Lisina-HCl (g/l)
DM1797	11,9	4,8
DM1797_ <i>gltAD5V</i>	11,2	5,3

Ejemplo 5

Incorporación de la mutación *gltAD5V* en la cepa *Brevibacterium lactofermentum* FERM BP-1763

60 La mutación *gltAD5V* debe de ser incorporada en la cepa *Brevibacterium lactofermentum* FERM BP-1763. La cepa FERM BP-1763 es una productora de valina resistente al ácido micofenólico (documento US-A-5.188.948). Ella es auxótrofa para L-isoleucina y L-metionina.

El vector pK18mobsacB_gltAD5V descrito en el Ejemplo 2 fue transferido por conjugación a la cepa FERM BP-1763 de acuerdo con el protocolo de Schäfer y colaboradores (Journal of Microbiology 172: 1663-1666 (1990). El vector no se puede replicar de manera autónoma en FERM BP-1763 y permanece conservado en la célula solamente cuando él se presenta integrado en el cromosoma como consecuencia de un suceso de recombinación. La selección de unos transconjugantes, es decir de unos clones con el pK18mobsacB_gltAD5V integrado, se efectuó mediante siembra en placas de la tanda de conjugación sobre un agar LB, que había sido suplementado con 25 mg/l de kanamicina y 50 mg/l de ácido nalidíxico. Los transconjugantes resistentes a la kanamicina fueron extendidos como un frote a continuación sobre placas de un agar LB suplementado con kanamicina (25 mg/l), y fueron incubados durante 24 horas a 33°C. Para realizar la selección de mutantes, en los que, como consecuencia de un segundo suceso de recombinación, había tenido lugar la escisión 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 un agar LB, que había sido suplementado con sacarosa al 10 %, y fueron incubados durante 24 horas a 33°C.

15 El plásmido pK18mobsacB_gltAD5V, al igual que el plásmido de partida pK18mobsacB, contiene junto al gen de resistencia a kanamicina una copia del gen sacB que codifica la levano sucrasa de *Bacillus subtilis*. La expresión del gen sacB, que es inducible por sacarosa, conduce a la formación de la levano sucrasa, que cataliza la síntesis del producto levano que es tóxico para *C. glutamicum*. Sobre un agar LB suplementado con sacarosa crecen por lo tanto sólo aquellos clones, en los que el pK18mobsacB_gltAD5V integrado se ha escindido como consecuencia de un segundo suceso de recombinación. En dependencia de la situación del segundo suceso de recombinación en lo que respecta al sitio de la mutación, tiene lugar en el caso de la escisión el intercambio de alelos o respectivamente la incorporación de la mutación, o la copia original permanece en el cromosoma del anfitrión..

20 A continuación se buscó un clon, en el que se había efectuado el intercambio deseado, es decir la incorporación de la mutación gltAD5V. Para esto, a partir de 10 clones con el fenotipo "crecimiento en presencia de sacarosa" y "ausencia de crecimiento en presencia de kanamicina", se determinó la secuencia del gen gltA. De esta manera se identificó un clon, que lleva la mutación gltAD5V. Esta cepa fue denominada como *C. glutamicum* FERM BP-1763_gltAD5V.

30 Ejemplo 6

Producción de L-valina

35 La cepa FERM BP_1763_gltAD5V obtenida en el Ejemplo 5 y la cepa de partida FERM BP-1763 se cultivaron en un medio nutritivo adecuado para la producción de valina y se determinó el contenido de valina en el material sobrenadante del cultivo.

40 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).

45 El medio CgIII (2,5 g/l de NaCl, 10 g/l de bacto-peptona, 10 g/l del extracto Bacto-Yeast, pH 7,4, 20 g/l de glucosa (autoclavada por separado) se utilizó para los cultivos previos. Los cultivos previos se incubaron durante 24 horas a 33°C y 240 rpm en un dispositivo sacudidor. A partir de estos cultivos previos se inoculó en cada caso un cultivo principal, de tal manera que la DO inicial (a 660 nm) del cultivo principal fue de 0,1 DO. Para el cultivo principal se utilizó asimismo el medio MM.

Medio MM

50	CSL	5 g/l
	MOPS	20 g/l
	glucosa (autoclavada por separado)	50 g/l
55	Sales:	
	(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
	MnSO ₄ * H ₂ O	5,0 mg/l
60	isoleucina (filtrada en condiciones estériles)	0,1 g/l
	metionina (filtrada en condiciones estériles)	0,1 g/l
	leucina (filtrada en condiciones estériles)	0,1 g/l
	tiamina * HCl (filtrada en condiciones estériles)	0,2 mg/l
	CaCO ₃	25 g/l

65

El CSL (líquido de maceración de maíz), el MOPS (ácido morfolinopropanosulfónico) y la solución de sales se ajustaron a pH 7 con agua amoniacal y se autoclavaron. A continuación, se añadieron las soluciones estériles de substrato y de vitaminas así como el CaCO₃ autoclavado en seco.

- 5 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 %.
- 10 Después de 48 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 valina formada se determinó con un dispositivo 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.

Tabla 2

Cepa	DO (660)	Valina (g/l)
FERM BP-1763	8,4	11,9
FERM BP-1763_dltAD5V	7,8	12,6

- 15 **Breve descripción de la Figura:**

Figura 1: Mapa del plásmido pK18mobsacB_gltAD5V

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

Kan:	gen de resistencia a la kanamicina
Sall:	sitio de corte con la enzima de restricción Sall
EcoRI:	sitio de corte con la enzima de restricción EcoRI
gltA:	fragmento de ADN clonado, que contiene la mutación gltAD5V
sacB:	gen sacB
RP4-mob:	región mob con el origen de la replicación para la transferencia (oriT)
oriV:	origen de la replicación V

Protocolo de secuencias:

5 <110> Degussa AG
 <120> Procedimiento para la producción de L-aminoácidos
 <130> 200600351
 10 <160> 31
 <170> PatentIn versión 3.3
 15 <210> 1
 <211> 1314
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum
 20 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1311)
 <223> gen de tipo silvestre gltA
 25 <220>
 <221> característica variada
 <222> (13)..(15)
 <400> 1
 30 atg ttt gaa agg gat atc gtg gct act gat aac aac aag gct gtc ctg 48
 Met Phe Glu Arg Asp Ile Val Ala Thr Asp Asn Asn Lys Ala Val Leu
 1 5 10 15
 cac tac ccc ggt ggc gag ttc gaa atg gac atc atc gag gct tct gag 96
 His Tyr Pro Gly Gly Glu Phe Glu Met Asp Ile Ile Glu Ala Ser Glu
 20 25 30
 ggt aac aac ggt gtt gtc ctg ggc aag atg ctg tct gag act gga ctg 144
 Gly Asn Asn Gly Val Val Leu Gly Lys Met Leu Ser Glu Thr Gly Leu
 35 40 45
 atc act ttt gac cca ggt tat gtg agc act ggc tcc acc gag tcg aag 192
 Ile Thr Phe Asp Pro Gly Tyr Val Ser Thr Gly Ser Thr Glu Ser Lys
 50 55 60
 atc acc tac atc gat ggc gat gcg gga atc ctg cgt tac cgc ggc tat 240
 Ile Thr Tyr Ile Asp Gly Asp Ala Gly Ile Leu Arg Tyr Arg Gly Tyr
 65 70 75 80
 gac atc gct gat ctg gct gag aat gcc acc ttc aac gag gtt tct tac 288
 Asp Ile Ala Asp Leu Ala Glu Asn Ala Thr Phe Asn Glu Val Ser Tyr
 85 90 95
 cta ctt atc aac ggt gag cta cca acc cca gat gag ctt cac aag ttt 336
 Leu Leu Ile Asn Gly Glu Leu Pro Thr Pro Asp Glu Leu His Lys Phe
 100 105 110
 aac gac gag att cgc cac acc ctt ctg gac gag gac ttc aag tcc 384
 Asn Asp Glu Ile Arg His His Thr Leu Leu Asp Glu Asp Phe Lys Ser
 115 120 125
 cag ttc aac gtg ttc cca cgc gac gct cac cca atg gca acc ttg gct 432
 Gln Phe Asn Val Phe Pro Arg Asp Ala His Pro Met Ala Thr Leu Ala
 130 135 140
 tcc tcg gtt aac att ttg tct acc tac tac cag gac cag ctg aac cca 480
 Ser Ser Val Asn Ile Leu Ser Thr Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Asn Pro
 145 150 155 160
 ctc gat gag gca cag ctt gat aag gca acc gtt cgc ctc atg gca aag 528

Leu	Asp	Glu	Ala	Gln	Leu	Asp	Lys	Ala	Thr	Val	Arg	Leu	Met	Ala	Lys	
165									170							175
gtt	cca	atg	ctg	gct	gcg	tac	gca	cac	cgc	gca	cgc	aag	ggt	gct	cct	576
Val	Pro	Met	Leu	Ala	Ala	Tyr	Ala	His	Arg	Ala	Arg	Lys	Gly	Ala	Pro	
180								185					190			
tac	atg	tac	cca	gac	aac	tcc	ctc	aat	gct	cgt	gag	aac	ttc	ctg	cgc	624
Tyr	Met	Tyr	Pro	Asp	Asn	Ser	Leu	Asn	Ala	Arg	Glu	Asn	Phe	Leu	Arg	
195							200				205					
atg	atg	tcc	ggt	tac	cca	acc	gag	cca	tac	gag	atc	gac	cca	atc	atg	672
Met	Met	Phe	Gly	Tyr	Pro	Thr	Glu	Pro	Tyr	Glu	Ile	Asp	Pro	Ile	Met	
210						215				220						
gtc	aag	gct	ctg	gac	aag	ctg	ctc	atc	ctg	cac	gct	gac	cac	gag	cag	720
Val	Lys	Ala	Leu	Asp	Lys	Leu	Leu	Ile	Leu	His	Ala	Asp	His	Glu	Gln	
225					230				235					240		
aac	tgc	tcc	acc	tcc	acc	gtt	cgt	atg	atc	ggt	tcc	gca	cag	gcc	aac	768
Asn	Cys	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Arg	Met	Ile	Gly	Ser	Ala	Gln	Ala	Asn	
245					250				255							
atg	ttt	gtc	tcc	atc	gct	ggt	goc	atc	aac	gct	ctg	tcc	ggc	cca	ctg	816
Met	Phe	Val	Ser	Ile	Ala	Gly	Gly	Ile	Asn	Ala	Leu	Ser	Gly	Pro	Leu	
260					265				270							
cac	ggc	gca	aac	cag	gct	gtt	ctg	gag	atg	ctc	gaa	gac	atc	aag	864	
His	Gly	Gly	Ala	Asn	Gln	Ala	Val	Leu	Glu	Met	Leu	Glu	Asp	Ile	Lys	
275					280				285							
agc	aac	cac	ggt	ggc	gac	gca	acc	gag	ttc	atg	aac	aag	gtc	aag	aac	912
Ser	Asn	His	Gly	Gly	Asp	Ala	Thr	Glu	Phe	Met	Asn	Lys	Val	Lys	Asn	
290					295				300							
aag	gaa	gac	ggc	gtc	cgc	ctc	atg	goc	ttc	gga	cac	cgc	gtt	tac	aag	960
Lys	Glu	Asp	Gly	Val	Arg	Leu	Met	Gly	Phe	Gly	His	Arg	Val	Tyr	Lys	
305					310				315					320		
aac	tac	gat	cca	cgt	gca	gca	atc	gtc	aag	gag	acc	gca	cac	gag	atc	1008
Asn	Tyr	Asp	Pro	Arg	Ala	Ala	Ile	Val	Lys	Glu	Thr	Ala	His	Glu	Ile	
325					330				335							
ctc	gag	cac	ctc	ggg	ggc	gac	gat	ctt	ctg	gat	ctg	gca	atc	aag	ctg	1056
Leu	Glu	His	Leu	Gly	Gly	Asp	Asp	Leu	Leu	Asp	Leu	Ala	Ile	Lys	Leu	
340					345				350							
gaa	gaa	att	gca	ctg	gct	gat	gat	tac	ttc	atc	tcc	cgc	aag	ctc	tac	1104
Glu	Glu	Ile	Ala	Leu	Ala	Asp	Asp	Tyr	Phe	Ile	Ser	Arg	Lys	Leu	Tyr	
355					360				365							
ccg	aac	gta	gac	ttc	tac	acc	ggc	ctg	atc	tac	cgc	gca	atg	ggc	ttc	1152
Pro	Asn	Val	Asp	Phe	Tyr	Thr	Gly	Leu	Ile	Tyr	Arg	Ala	Met	Gly	Phe	
370					375				380							
cca	act	gac	ttc	tcc	acc	gta	ttg	ttc	gca	atc	ggt	cgt	ctg	cca	gga	1200
Pro	Thr	Asp	Phe	Phe	Thr	Val	Leu	Phe	Ala	Ile	Gly	Arg	Leu	Pro	Gly	
385					390				395					400		
tgg	atc	gct	cac	tac	cgc	gag	cag	ctc	ggt	gca	gca	ggc	aac	aag	atc	1248
Trp	Ile	Ala	His	Tyr	Arg	Glu	Gln	Leu	Gly	Ala	Ala	Gly	Asn	Lys	Ile	
405					410				415							
aac	cgc	cca	cgc	cag	gtc	tac	acc	ggc	aac	gaa	tcc	cgc	aag	ttg	gtt	1296
Asn	Arg	Pro	Arg	Gln	Val	Tyr	Thr	Gly	Asn	Glu	Ser	Arg	Lys	Leu	Val	
420					425				430							
cct	cgc	gag	gag	cgc	taa											1314
Pro	Arg	Glu	Glu	Arg												

<210> 2
 <211> 437
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

5

<400> 2

Met Phe Glu Arg Asp Ile Val Ala Thr Asp Asn Asn Lys Ala Val Leu
 1 5 10 15

His Tyr Pro Gly Gly Glu Phe Glu Met Asp Ile Ile Glu Ala Ser Glu
 20 25 30

Gly Asn Asn Gly Val Val Leu Gly Lys Met Leu Ser Glu Thr Gly Leu
 35 40 45

Ile Thr Phe Asp Pro Gly Tyr Val Ser Thr Gly Ser Thr Glu Ser Lys
 50 55 60

Ile Thr Tyr Ile Asp Gly Asp Ala Gly Ile Leu Arg Tyr Arg Gly Tyr
 65 70 75 80

Asp Ile Ala Asp Leu Ala Glu Asn Ala Thr Phe Asn Glu Val Ser Tyr
 85 90 95

Leu Leu Ile Asn Gly Glu Leu Pro Thr Pro Asp Glu Leu His Lys Phe
 100 105 110

Asn Asp Glu Ile Arg His His Thr Leu Leu Asp Glu Asp Phe Lys Ser
 115 120 125

Gln Phe Asn Val Phe Pro Arg Asp Ala His Pro Met Ala Thr Leu Ala
 130 135 140

Ser Ser Val Asn Ile Leu Ser Thr Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Asn Pro
 145 150 155 160

Leu Asp Glu Ala Gln Leu Asp Lys Ala Thr Val Arg Leu Met Ala Lys
 165 170 175

Val Pro Met Leu Ala Ala Tyr Ala His Arg Ala Arg Lys Gly Ala Pro
 180 185 190

Tyr Met Tyr Pro Asp Asn Ser Leu Asn Ala Arg Glu Asn Phe Leu Arg
 195 200 205

Met Met Phe Gly Tyr Pro Thr Glu Pro Tyr Glu Ile Asp Pro Ile Met
 210 215 220

Val Lys Ala Leu Asp Lys Leu Leu Ile Leu His Ala Asp His Glu Gln
 225 230 235 240

Asn Cys Ser Thr Ser Thr Val Arg Met Ile Gly Ser Ala Gln Ala Asn
 245 250 255
 Met Phe Val Ser Ile Ala Gly Gly Ile Asn Ala Leu Ser Gly Pro Leu
 260 265 270
 His Gly Gly Ala Asn Gln Ala Val Leu Glu Met Leu Glu Asp Ile Lys
 275 280 285
 Ser Asn His Gly Gly Asp Ala Thr Glu Phe Met Asn Lys Val Lys Asn
 290 295 300
 Lys Glu Asp Gly Val Arg Leu Met Gly Phe Gly His Arg Val Tyr Lys
 305 310 315 320
 Asn Tyr Asp Pro Arg Ala Ala Ile Val Lys Glu Thr Ala His Glu Ile
 325 330 335
 Leu Glu His Leu Gly Gly Asp Asp Leu Leu Asp Leu Ala Ile Lys Leu
 340 345 350
 Glu Glu Ile Ala Leu Ala Asp Asp Tyr Phe Ile Ser Arg Lys Leu Tyr
 355 360 365
 Pro Asn Val Asp Phe Tyr Thr Gly Leu Ile Tyr Arg Ala Met Gly Phe
 370 375 380
 Pro Thr Asp Phe Phe Thr Val Leu Phe Ala Ile Gly Arg Leu Pro Gly
 385 390 395 400
 Trp Ile Ala His Tyr Arg Glu Gln Leu Gly Ala Ala Gly Asn Lys Ile
 405 410 415
 Asn Arg Pro Arg Gln Val Tyr Thr Gly Asn Glu Ser Arg Lys Leu Val
 420 425 430
 Pro Arg Glu Glu Arg
 435

- 5 <210> 3
 <211> 2814
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum
- 10 <220>
 <221> característica variada
 <222> (1)..(750)
 <223> secuencia situada corriente arriba de la región codificadora
- 15 <220>
 <221> CDS
 <222> (751)..(2061)
 <223> gen gltA de tipo silvestre
- 20 <220>
 <221> característica variada
 <222> (763)..(765)
- <220>
 <221> característica variada
 <222> (2062)..(2814)

ES 2 382 363 T3

<223> secuencia situada corriente arriba de la región codificadora

<400> 3

agggcagggt ggggaagtgc gtcatgtctt cggcaactt tctgcgcctt gaagtaaaag	60
ggccaggat cgtaacgat ctgacccaaac aactataacc ctgaagctgt cagttcctag	120
caccctagat tcttcacgca gtctcccaa cgtgaaaaaa cgcccaaaac tggcgacacc	180
gaactattga aaacgcgggg attagttgac cagccaccaa tttggggta gctcaaagtt	240
ttgcaaagtt ttcaatttctt aggttgttaa tatccctga ggttgcgtta tagggtggcg	300
aattgcattgg ggaaagctac tcggcaccca tccttgcgc gtgcattaca aactttgcta	360
aactgtgcac cagtccactt attgtggat tttatgcc ttaaaggcca gcattttcac	420
cctctagcgg ggttgaatgc tggccttgag ggtcagaac taaatagcag cacatcggca	480
caattgatct gagttctatt ggcgtgaccg tggctactga ttacggtggc tgggtgggt	540
cggaaatgat gtaaccaacg tgattgtggg ggaattggct ctcacttcgg atatggctaa	600
accgcattta tcggtatagc gtgttaaccg gaccagattt ggaaagaaaat gtgtcgagta	660
acaaaaactg acatgcgcctt ggcgcattttt agttggtaag aataaacggg actacttccg	720
taatccggaa gagttttttt ccgaacaaat atg ttt gaa agg gat atc gtg gct	774
Met Phe Glu Arg Asp Ile Val Ala	
1 5	
act gat aac aac aag gct gtc ctg cac tac ccc ggt gac gag ttc gaa	822
Thr Asp Asn Asn Lys Ala Val Leu His Tyr Pro Gly Gly Glu Phe Glu	
10 15 20	
atg gac atc atc gag gct tct gag ggt aac aac ggt gtt gtc ctg ggc	870
Met Asp Ile Ile Glu Ala Ser Glu Gly Asn Asn Gly Val Val Leu Gly	
25 30 35 40	
aag atg ctg tct gag act gga ctg atc act ttt gac cca ggt tat gtg	918
Lys Met Leu Ser Glu Thr Gly Leu Ile Thr Phe Asp Pro Gly Tyr Val	
45 50 55	
agc act ggc tcc acc gag tcg aag atc acc tac atc gat ggc gat gcg	966
Ser Thr Gly Ser Thr Glu Ser Lys Ile Thr Tyr Ile Asp Gly Asp Ala	
60 65 70	
gga atc ctg cgt tac cgc ggc tat gac atc gct gat ctg gct gag aat	1014
Gly Ile Leu Arg Tyr Arg Gly Tyr Asp Ile Ala Asp Leu Ala Glu Asn	
75 80 85	
gcc acc ttc aac gag gtt tct tac cta ctt atc aac ggt gag cta cca	1062
Ala Thr Phe Asn Glu Val Ser Tyr Leu Leu Ile Asn Gly Glu Leu Pro	
90 95 100	
acc cca gat gag ctt cac aag ttt aac gac gag att cgc cac cac acc	1110
Thr Pro Asp Glu Leu His Lys Phe Asn Asp Glu Ile Arg His His Thr	
105 110 115 120	
ctt ctg gac gag gac ttc aag tcc cag ttc aac gtg ttc cca cgc gac	1158
Leu Leu Asp Glu Asp Phe Lys Ser Gln Phe Asn Val Phe Pro Arg Asp	
125 130 135	

ES 2 382 363 T3

gct cac cca atg gca acc ttg gct tcc tcg gtt aac att ttg tct acc Ala His Pro Met Ala Thr Leu Ala Ser Ser Val Asn Ile Leu Ser Thr 140 145 150	1206
tac tac cag gac cag ctg aac cca ctc gat gag gca cag ctt gat aag Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Asn Pro Leu Asp Glu Ala Gln Leu Asp Lys 155 160 165	1254
gca acc gtt cgc ctc atg gca aag gtt cca atg ctg gct gcg tac gca Ala Thr Val Arg Leu Met Ala Lys Val Pro Met Leu Ala Ala Tyr Ala 170 175 180	1302
cac cgc gca cgc aag ggt gct cct tac atg tac cca gac aac tcc ctc His Arg Ala Arg Lys Gly Ala Pro Tyr Met Tyr Pro Asp Asn Ser Leu 185 190 195 200	1350
aat gcg cgt gag aac ttc ctg cgc atg atg ttc ggt tac cca acc gag Asn Ala Arg Glu Asn Phe Leu Arg Met Met Phe Gly Tyr Pro Thr Glu 205 210 215	1398
cca tac gag atc gac cca atc atg gtc aag gct ctg gac aag ctg ctc Pro Tyr Glu Ile Asp Pro Ile Met Val Lys Ala Leu Asp Lys Leu Leu 220 225 230	1446
atc ctg cac gct gac cac gag cag aac tgc tcc acc tcc acc gtt cgt Ile Leu His Ala Asp His Glu Gln Asn Cys Ser Thr Ser Thr Val Arg 235 240 245	1494
atg atc ggt tcc gca cag gcc aac atg ttt gtc tcc atc gct ggt ggc Met Ile Gly Ser Ala Gln Ala Asn Met Phe Val Ser Ile Ala Gly Gly 250 255 260	1542
atc aac gct ctg tcc ggc cca ctg cac ggt ggc gca aac cag gct gtt Ile Asn Ala Leu Ser Gly Pro Leu His Gly Gly Ala Asn Gln Ala Val 265 270 275 280	1590
ctg gag atg ctc gaa gac atc aag agc aac cac ggt ggc gac gca acc Leu Glu Met Leu Glu Asp Ile Lys Ser Asn His Gly Gly Asp Ala Thr 285 290 295	1638
gag ttc atg aac aag gtc aag aac aag gaa gac ggc gtc cgc ctc atg Glu Phe Met Asn Lys Val Lys Asn Lys Glu Asp Gly Val Arg Leu Met 300 305 310	1686
ggc ttc gga cac cgc gtt tac aag aac tac gat cca cgt gca gca atc Gly Phe Gly His Arg Val Tyr Lys Asn Tyr Asp Pro Arg Ala Ala Ile 315 320 325	1734
gtc aag gag acc gca cac gag atc ctc gag cac ctc ggt ggc gac gat Val Lys Glu Thr Ala His Glu Ile Leu Glu His Leu Gly Gly Asp Asp 330 335 340	1782
ctt ctg gat ctg gca atc aag ctg gaa gaa att gca ctg gct gat gat Leu Leu Asp Leu Ala Ile Lys Leu Glu Glu Ile Ala Leu Ala Asp Asp 345 350 355 360	1830
tac ttc atc tcc cgc aag ctc tac ccg aac gta gac ttc tac acc ggc Tyr Phe Ile Ser Arg Lys Leu Tyr Pro Asn Val Asp Phe Tyr Thr Gly 365 370 375	1878
ctg atc tac cgc gca atg ggc ttc cca act gac ttc ttc acc gta ttg Leu Ile Tyr Arg Ala Met Gly Phe Pro Thr Asp Phe Phe Thr Val Leu 380 385 390	1926
ttc gca atc ggt cgt ctg cca gga tgg atc gct cac tac cgc gag cag Phe Ala Ile Gly Arg Leu Pro Gly Trp Ile Ala His Tyr Arg Glu Gln 395 400 405	1974

ctc ggt gca gca ggc aac aag atc aac cgc cca cgc cag gtc tac acc	2022
Leu Gly Ala Ala Gly Asn Lys Ile Asn Arg Pro Arg Gln Val Tyr Thr	
410 415 420	
ggc aac gaa tcc cgc aag ttg gtt cct cgc gag gag cgc taaaatttagc	2071
Gly Asn Glu Ser Arg Lys Leu Val Pro Arg Glu Glu Arg	
425 430 435	
ggatgattct cgttcaactt cggccgaagc cacttcgtct gtcataatga cagggatgg	2131
ttcggccgtt tttgcataaa accaaaaat acgattttca aggagcatgt acagcacatg	2191
gaaaagccac agattgagct accggctcggt ccagcaccgg aagatctcg aatctctgac	2251
atcatcggtt gcgaggagc agaagccgc ccaggtggag aagttgaggt ccactatgtg	2311
ggcgttgact ttgaaaccgg cgaggagttt gactcttcctt gggatcgtgg acagaccagc	2371
cagttccac tcaacggcctt cattgcagg tggcaagagg gaattccagg catgaagg	2431
ggcggacgtc gtcagctgac cattccgcca gaggctgctt acggccctga gggttccggc	2491
caccactgt ctggccgtac cttgggttcc atcatcgatt tgatcagcgc ataattttct	2551
ttactgcgtt aaacgctcaa atcgtgtgaa gcgactgtcg cgtccggccc tctccggatt	2611
gttatccaaat tcggagaggg cgttgctgat tgcgtccgaga atttcttcaa caaagtgc	2671
ggtttcggcg acgatcccgt cgataagccc ttggcttaaa agtgcgtgcg cctgcacgccc	2731
ttgtcgctct atgatttccg cggcgtgggtt ggtgtcgcgg aagaggatgg ccgaggcgcc	2791
ctctggtggc aatgcggaca gcc	2814

5 <210> 4
 <211> 437
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum
 <400> 4

Met Phe Glu Arg Asp Ile Val Ala Thr Asp Asn Asn Lys Ala Val Leu	
1 5 10 15	
His Tyr Pro Gly Gly Glu Phe Glu Met Asp Ile Ile Glu Ala Ser Glu	
20 25 30	
Gly Asn Asn Gly Val Val Leu Gly Lys Met Leu Ser Glu Thr Gly Leu	
35 40 45	
Ile Thr Phe Asp Pro Gly Tyr Val Ser Thr Gly Ser Thr Glu Ser Lys	
50 55 60	
Ile Thr Tyr Ile Asp Gly Asp Ala Gly Ile Leu Arg Tyr Arg Gly Tyr	
65 70 75 80	
Asp Ile Ala Asp Leu Ala Glu Asn Ala Thr Phe Asn Glu Val Ser Tyr	
85 90 95	
Leu Leu Ile Asn Gly Glu Leu Pro Thr Pro Asp Glu Leu His Lys Phe	
100 105 110	

Asn Asp Glu Ile Arg His His Thr Leu Leu Asp Glu Asp Phe Lys Ser
 115 120 125

Gln Phe Asn Val Phe Pro Arg Asp Ala His Pro Met Ala Thr Leu Ala
 130 135 140

Ser Ser Val Asn Ile Leu Ser Thr Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Asn Pro
 145 150 155 160

Leu Asp Glu Ala Gln Leu Asp Lys Ala Thr Val Arg Leu Met Ala Lys
 165 170 175

Val Pro Met Leu Ala Ala Tyr Ala His Arg Ala Arg Lys Gly Ala Pro
 180 185 190

Tyr Met Tyr Pro Asp Asn Ser Leu Asn Ala Arg Glu Asn Phe Leu Arg
 195 200 205

Met Met Phe Gly Tyr Pro Thr Glu Pro Tyr Glu Ile Asp Pro Ile Met
 210 215 220

Val Lys Ala Leu Asp Lys Leu Leu Ile Leu His Ala Asp His Glu Gln
 225 230 235 240

Asn Cys Ser Thr Ser Thr Val Arg Met Ile Gly Ser Ala Gln Ala Asn
 245 250 255

Met Phe Val Ser Ile Ala Gly Gly Ile Asn Ala Leu Ser Gly Pro Leu
 260 265 270

His Gly Gly Ala Asn Gln Ala Val Leu Glu Met Leu Glu Asp Ile Lys
 275 280 285

Ser Asn His Gly Gly Asp Ala Thr Glu Phe Met Asn Lys Val Lys Asn
 290 295 300

Lys Glu Asp Gly Val Arg Leu Met Gly Phe Gly His Arg Val Tyr Lys
 305 310 315 320

Asn Tyr Asp Pro Arg Ala Ala Ile Val Lys Glu Thr Ala His Glu Ile
 325 330 335

Leu Glu His Leu Gly Gly Asp Asp Leu Leu Asp Leu Ala Ile Lys Leu
 340 345 350

Glu Glu Ile Ala Leu Ala Asp Asp Tyr Phe Ile Ser Arg Lys Leu Tyr
 355 360 365

Pro Asn Val Asp Phe Tyr Thr Gly Leu Ile Tyr Arg Ala Met Gly Phe
 370 375 380

ES 2 382 363 T3

Pro Thr Asp Phe Phe Thr Val Leu Phe Ala Ile Gly Arg Leu Pro Gly
 385 390 395 400
 Trp Ile Ala His Tyr Arg Glu Gln Leu Gly Ala Ala Gly Asn Lys Ile
 405 410 415
 Asn Arg Pro Arg Gln Val Tyr Thr Gly Asn Glu Ser Arg Lys Leu Val
 420 425 430
 Pro Arg Glu Glu Arg
 435

5 <210> 5
 <211> 1314
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum
 10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1311)
 <223> alelo gltA
 15 <220>
 <221> característica variada
 <222> (13)..(15)
 20 <220>
 <221> mutación
 <222> (14)..(14)
 <223> transversión A > T
 <400> 5

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

ES 2 382 363 T3

cag ttc aac gtc ttc cca cgc gac gct cac cca atg gca acc ttg gct Gln Phe Asn Val Phe Pro Arg Asp Ala His Pro Met Ala Thr Leu Ala 130 135 140	432
tcc tcg gtt aac att ttg tct acc tac tac cag gac cag ctg aac cca Ser Ser Val Asn Ile Leu Ser Thr Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Asn Pro 145 150 155 160	480
ctc gat gag gca cag ctt gat aag gca acc gtc cgc ctc atg gca aag Leu Asp Glu Ala Gln Leu Asp Lys Ala Thr Val Arg Leu Met Ala Lys 165 170 175	528
gtt cca atg ctg gct gcg tac gca cac cgc gca cgc aag ggt gct cct Val Pro Met Leu Ala Ala Tyr Ala His Arg Ala Arg Lys Gly Ala Pro 180 185 190	576
tac atg tac cca gac aac tcc ctc aat gcg cgt gag aac ttc ctg cgc Tyr Met Tyr Pro Asp Asn Ser Leu Asn Ala Arg Glu Asn Phe Leu Arg 195 200 205	624
atg atg ttc ggt tac cca acc gag cca tac gag atc gac cca atc atg Met Met Phe Gly Tyr Pro Thr Glu Pro Tyr Glu Ile Asp Pro Ile Met 210 215 220	672
gtc aag gct ctg gac aag ctg ctc atc ctg cac gct gac cac gag cag Val Lys Ala Leu Asp Lys Leu Leu Ile Leu His Ala Asp His Glu Gln 225 230 235 240	720
aac tgc tcc acc tcc acc gtt cgt atg atc ggt tcc gca cag gcc aac Asn Cys Ser Thr Ser Thr Val Arg Met Ile Gly Ser Ala Gln Ala Asn 245 250 255	768
atg ttt gtc tcc atc gct ggt ggc atc aac gct ctg tcc ggc cca ctg Met Phe Val Ser Ile Ala Gly Gly Ile Asn Ala Leu Ser Gly Pro Leu 260 265 270	816
cac ggt ggc gca aac cag gct gtt ctg gag atg ctc gaa gac atc aag His Gly Gly Ala Asn Gln Ala Val Leu Glu Met Leu Glu Asp Ile Lys 275 280 285	864
agc aac cac ggt ggc gca acc gag ttc atg aac aag gtc aag aac Ser Asn His Gly Gly Asp Ala Thr Glu Phe Met Asn Lys Val Lys Asn 290 295 300	912
aag gaa gac ggc gtc cgc ctc atg ggc ttc gga cac cgc gtt tac aag Lys Glu Asp Gly Val Arg Leu Met Gly Phe His Arg Val Tyr Lys 305 310 315 320	960
aac tac gat cca cgt gca gca atc gtc aag gag acc gca cac gag atc Asn Tyr Asp Pro Arg Ala Ala Ile Val Lys Glu Thr Ala His Glu Ile 325 330 335	1008
ctc gag cac ctc ggt ggc gac gat ctt ctg gat ctg gca atc aag ctg Leu Glu His Leu Gly Gly Asp Asp Leu Leu Asp Leu Ala Ile Lys Leu 340 345 350	1056
gaa gaa att gca ctg gct gat gat tac ttc atc tcc cgc aag ctc tac Glu Glu Ile Ala Leu Ala Asp Asp Tyr Phe Ile Ser Arg Lys Leu Tyr 355 360 365	1104
ccg aac gta gac ttc tac acc ggc ctg atc tac cgc gca atg ggc ttc Pro Asn Val Asp Phe Tyr Thr Gly Leu Ile Tyr Arg Ala Met Gly Phe 370 375 380	1152
cca act gac ttc ttc acc gta ttg ttc gca atc ggt cgt ctg cca gga Pro Thr Asp Phe Phe Thr Val Leu Phe Ala Ile Gly Arg Leu Pro Gly 385 390 395 400	1200
tgg atc gct cac tac cgc gag cag ctc ggt gca gca ggc aac aag atc	1248

Trp Ile Ala His Tyr Arg Glu Gln Leu Gly Ala Ala Gly Asn Lys Ile
 405 410 415

aac cgc cca cgc cag gtc tac acc ggc aac gaa tcc cgc aag ttg gtt 1296
 Asn Arg Pro Arg Gln Val Tyr Thr Gly Asn Glu Ser Arg Lys Leu Val
 420 425 430

cct cgc gag gag cgc taa 1314
 Pro Arg Glu Glu Arg
 435

<210> 6
 <211> 437
 5 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 6

Met Phe Glu Arg Val Ile Val Ala Thr Asp Asn Asn Lys Ala Val Leu
 1 5 10 15

His Tyr Pro Gly Gly Glu Phe Glu Met Asp Ile Ile Glu Ala Ser Glu
 20 25 30

Gly Asn Asn Gly Val Val Leu Gly Lys Met Leu Ser Glu Thr Gly Leu
 35 40 45

Ile Thr Phe Asp Pro Gly Tyr Val Ser Thr Gly Ser Thr Glu Ser Lys
 50 55 60

Ile Thr Tyr Ile Asp Gly Asp Ala Gly Ile Leu Arg Tyr Arg Gly Tyr
 65 70 75 80

Asp Ile Ala Asp Leu Ala Glu Asn Ala Thr Phe Asn Glu Val Ser Tyr
 85 90 95

Leu Leu Ile Asn Gly Glu Leu Pro Thr Pro Asp Glu Leu His Lys Phe
 100 105 110

Asn Asp Glu Ile Arg His His Thr Leu Leu Asp Glu Asp Phe Lys Ser
 115 120 125

Gln Phe Asn Val Phe Pro Arg Asp Ala His Pro Met Ala Thr Leu Ala
 130 135 140

Ser Ser Val Asn Ile Leu Ser Thr Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Asn Pro
 145 150 155 160

Leu Asp Glu Ala Gln Leu Asp Lys Ala Thr Val Arg Leu Met Ala Lys
 165 170 175

Val Pro Met Leu Ala Ala Tyr Ala His Arg Ala Arg Lys Gly Ala Pro
 180 185 190

Tyr Met Tyr Pro Asp Asn Ser Leu Asn Ala Arg Glu Asn Phe Leu Arg
 195 200 205

ES 2 382 363 T3

Met Met Phe Gly Tyr Pro Thr Glu Pro Tyr Glu Ile Asp Pro Ile Met
210 215 220

Val Lys Ala Leu Asp Lys Leu Leu Ile Leu His Ala Asp His Glu Gln
225 230 235 240

Asn Cys Ser Thr Ser Thr Val Arg Met Ile Gly Ser Ala Gln Ala Asn
245 250 255

Met Phe Val Ser Ile Ala Gly Gly Ile Asn Ala Leu Ser Gly Pro Leu
260 265 270

His Gly Gly Ala Asn Gln Ala Val Leu Glu Met Leu Glu Asp Ile Lys
275 280 285

Ser Asn His Gly Gly Asp Ala Thr Glu Phe Met Asn Lys Val Lys Asn
290 295 300

Lys Glu Asp Gly Val Arg Leu Met Gly Phe Gly His Arg Val Tyr Lys
305 310 315 320

Asn Tyr Asp Pro Arg Ala Ala Ile Val Lys Glu Thr Ala His Glu Ile
325 330 335

Leu Glu His Leu Gly Gly Asp Asp Leu Leu Asp Leu Ala Ile Lys Leu
340 345 350

Glu Glu Ile Ala Leu Ala Asp Asp Tyr Phe Ile Ser Arg Lys Leu Tyr
355 360 365

Pro Asn Val Asp Phe Tyr Thr Gly Leu Ile Tyr Arg Ala Met Gly Phe
370 375 380

Pro Thr Asp Phe Phe Thr Val Leu Phe Ala Ile Gly Arg Leu Pro Gly
385 390 395 400

Trp Ile Ala His Tyr Arg Glu Gln Leu Gly Ala Ala Gly Asn Lys Ile
405 410 415

Asn Arg Pro Arg Gln Val Tyr Thr Gly Asn Glu Ser Arg Lys Leu Val
420 425 430

Pro Arg Glu Glu Arg
435

<210> 7
<211> 2814

5 <212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<221> característica variada

10 <222> (1)..(750)
<223> secuencia situada corriente arriba de la secuencia codificadora

5 <220>
 <221> CDS
 <222> (751)..(2061)
 <223> alelo gltA
 10 <220>
 <221> característica variada
 <222> (763)..(765)
 15 <220>
 <221> característica variada
 <222> (2062)..(2814)
 <223> secuencia situada corriente arriba de la región codificadora
 20 <400> 7

agggcagggt	ggggaaagtgc	gtcatgtctt	cgggcaactt	tctgcgcctt	gaagtaaaag	60
ggccaggat	cgttaacgt	ctgacccaac	aactataacc	ctgaagctgt	cagttcctag	120
caccctagat	tcttcacgca	gtctccaaa	cgatgaaaaa	cgcacaaac	tggcgacacc	180
gaactattga	aaacgcgggg	attagttgac	cagccaccaa	tttggggta	gctcaaagtt	240
ttgcaaagtt	ttcaatttct	aggttgttaa	tatcccctga	ggttgcgtta	tagggtggcg	300
aattgcatgg	ggaaagctac	tcggcaccca	tccttgcgc	gtgcatcaca	aactttgcta	360
aactgtgcac	cagtccactt	attgtggat	tttaatgccc	ttaaaggcca	gcattttcac	420
cctctagcgg	ggttgaatgc	tggccttgag	ggtgcagaac	taaatagcag	cacatcgca	480
caattgatct	gagttctatt	ggcgtgaccg	tggctactga	ttacggtggc	tgtgggttgt	540
cgggaatgat	gtaaccaacg	tgattgtggg	ggaattggct	ctcaacttcgg	atatggctaa	600
accgcattta	tcggtatagc	gtgttaaccg	gaccagattt	ggaaagaaaat	gtgtcgagta	660
acaaaaactg	acatgcgcctt	ggcgcacccc	agttggtaag	aataaacggg	actacttcgg	720
taatccggaa	gagttttttt	ccgaacaaat	atg ttt gaa agg gtt atc gtg gct			774
			Met Phe Glu Arg Val Ile Val Ala			
			1 5			
act gat aac aac aag gct gtc ctg cac tac ccc ggt ggc gag ttc gaa						822
Thr Asp Asn Asn Lys Ala Val Leu His Tyr Pro Gly Gly Glu Phe Glu						
10 15 20						
atg gac atc atc gag gct tct gag ggt aac aac ggt gtt gtc ctg ggc						870
Met Asp Ile Ile Glu Ala Ser Glu Gly Asn Asn Gly Val Val Leu Gly						
25 30 35 40						
aag atg ctg tct gag act gga ctg atc act ttt gac cca ggt tat gtg						918
Lys Met Leu Ser Glu Thr Gly Leu Ile Thr Phe Asp Pro Gly Tyr Val						
45 50 55						
agc act ggc tcc acc gag tcg aag atc acc tac atc gat ggc gat gcg						966
Ser Thr Gly Ser Thr Glu Ser Lys Ile Thr Tyr Ile Asp Gly Asp Ala						
60 65 70						
gga atc ctg cgt tac cgc ggc tat gac atc gct gat ctg gct gag aat						1014

ES 2 382 363 T3

Gly Ile Leu Arg Tyr Arg Gly Tyr Asp Ile Ala Asp Leu Ala Glu Asn		
75 80 85		
gcc acc ttc aac gag gtt tct tac cta ctt atc aac ggt gag cta cca	1062	
Ala Thr Phe Asn Glu Val Ser Tyr Leu Leu Ile Asn Gly Glu Leu Pro		
90 95 100		
acc cca gat gag ctt cac aag ttt aac gac gag att cgc cac cac acc	1110	
Thr Pro Asp Glu Leu His Lys Phe Asn Asp Glu Ile Arg His His Thr		
105 110 115 120		
ctt ctg gac gag gac ttc aag tcc cag ttc aac gtg ttc cca cgc gac	1158	
Leu Leu Asp Glu Asp Phe Lys Ser Gln Phe Asn Val Phe Pro Arg Asp		
125 130 135		
gct cac cca atg gca acc ttg gct tcc tcg gtt aac att ttg tct acc	1206	
Ala His Pro Met Ala Thr Leu Ala Ser Ser Val Asn Ile Leu Ser Thr		
140 145 150		
tac tac cag gag cag ctg aac cca ctc gat gag gca gag ctt gat aag	1254	
Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Asn Pro Leu Asp Glu Ala Gln Leu Asp Lys		
155 160 165		
gca acc gtt cgc ctc atg gca aag gtt cca atg ctg gct gcg tac gca	1302	
Ala Thr Val Arg Leu Met Ala Lys Val Pro Met Leu Ala Ala Tyr Ala		
170 175 180		
cac cgc gca cgc aag ggt gct cct tac atg tac cca gac aac tcc ctc	1350	
His Arg Ala Arg Lys Gly Ala Pro Tyr Met Tyr Pro Asp Asn Ser Leu		
185 190 195 200		
aat gcg cgt gag aac ttc ctg cgc atg atg ttc ggt tac cca acc gag	1398	
Asn Ala Arg Glu Asn Phe Leu Arg Met Met Phe Gly Tyr Pro Thr Glu		
205 210 215		
cca tac gag atc gac cca atc atg gtc aag gct ctg gac aag ctg ctc	1446	
Pro Tyr Glu Ile Asp Pro Ile Met Val Lys Ala Leu Asp Lys Leu Leu		
220 225 230		
atc ctg cac gct gac cac gag cag aac tgc tcc acc tcc acc gtt cgt	1494	
Ile Leu His Ala Asp His Glu Gln Asn Cys Ser Thr Ser Thr Val Arg		
235 240 245		
atg atc ggt tcc gca cag gcc aac atg ttt gtc tcc atc gct ggt ggc	1542	
Met Ile Gly Ser Ala Gln Ala Asn Met Phe Val Ser Ile Ala Gly Gly		
250 255 260		
atc aac gct ctg tcc ggc cca ctg cac ggt ggc gca aac cag gct gtt	1590	
Ile Asn Ala Leu Ser Gly Pro Leu His Gly Gly Ala Asn Gln Ala Val		
265 270 275 280		
ctg gag atg ctc gaa gac atc aag agc aac cac ggt ggc gac gca acc	1638	
Leu Glu Met Leu Glu Asp Ile Lys Ser Asn His Gly Gly Asp Ala Thr		
285 290 295		
gag ttc atg aac aag gtc aag aac aag gaa gac ggc gtc cgc ctc atg	1686	
Glu Phe Met Asn Lys Val Lys Asn Lys Glu Asp Gly Val Arg Leu Met		
300 305 310		
ggc ttc gca cac cgc gtt tac aag aac tac gat cca cgt gca gca atc	1734	
Gly Phe Gly His Arg Val Tyr Lys Asn Tyr Asp Pro Arg Ala Ala Ile		
315 320 325		
gtc aag gag acc gca cac gag atc ctc gag cac ctc ggt ggc gac gat	1782	
Val Lys Glu Thr Ala His Glu Ile Leu Glu His Leu Gly Gly Asp Asp		
330 335 340		
ctt ctg gat ctg gca atc aag ctg gaa gaa att gca ctg gct gat gat	1830	
Leu Leu Asp Leu Ala Ile Lys Leu Glu Ile Ala Leu Ala Asp Asp		

ES 2 382 363 T3

345	350	355	360	
tac ttc atc tcc cgc aag ctc tac ccg aac gta gac ttc tac acc ggc Tyr Phe Ile Ser Arg Lys Leu Tyr Pro Asn Val Asp Phe Tyr Thr Gly 365 370 375				1878
ctg atc tac cgc gca atg ggc ttc cca act gac ttc ttc acc gta ttg Leu Ile Tyr Arg Ala Met Gly Phe Pro Thr Asp Phe Phe Thr Val Leu 380 385 390				1926
ttc gca atc ggt cgt ctg cca gga tgg atc gct cac tac cgc gag cag Phe Ala Ile Gly Arg Leu Pro Gly Trp Ile Ala His Tyr Arg Glu Gln 395 400 405				1974
ctc ggt gca gca ggc aac aag atc aac cgc cca cgc cag gtc tac acc Leu Gly Ala Ala Gly Asn Lys Ile Asn Arg Pro Arg Gln Val Tyr Thr 410 415 420				2022
ggc aac gaa tcc cgc aag ttg gtt cct cgc gag gag cgc taaatttagc Gly Asn Glu Ser Arg Lys Leu Val Pro Arg Glu Glu Arg 425 430 435				2071
ggatgattct cgttcaacctt cggccgaagc cacttcgtct gtcataatga cagggatgg ttcggccgtt tttgcataaa accaaaaat acgattttca aggagcatgt acagcacatg gaaaagccac agattgagct accggcgttgt ccagcaccgg aagatctcgt aatctctgac atcatcggtt gcgaaaggagc agaagcccgc ccaggtggag aagttgaggt ccactatgt ggcgttgact ttgaaaccgg cgaggagttt gactttccct gggatcgtgg acagaccagc cagttcccac tcaacggcct cattgcaggt tggcaagagg gaattccagg catgaaggc ggcggacgtc gtcagctgac cattccgcca gaggctgctt acggccctga gggttccggc caccactgt ctggccgtac cctgggtttc atcatcgatt tgatcagcgc ataattttct ttactgcgtc aaacgctcaa atcgtgtgaa gcgactgtcg cgtccccc tctccggatt gttatccaat tcggagaggg cgttgctgat tgtgccgaga atttctcaa caaagtgt ggtttcggcg acgatccgt cgataagccc ttggcttaaa agtgcgtgcg cctgcacgccc ttgtcgctct atgatttccg cggcggtt ggtgtcgcgg aagaggatgg ccgaggcgccc ctctggtggc aatgcggaca gcc				2131
				2191
				2251
				2311
				2371
				2431
				2491
				2551
				2611
				2671
				2731
				2791
				2814

<210> 8

<211> 437

5 <212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 8

Met	Phe	Glu	Arg	Val	Ile	Val	Ala	Thr	Asp	Asn	Asn	Lys	Ala	Val	Leu
1				5				10				15			

His	Tyr	Pro	Gly	Gly	Glu	Phe	Glu	Met	Asp	Ile	Ile	Glu	Ala	Ser	Glu
				20				25				30			

Gly	Asn	Asn	Gly	Val	Val	Leu	Gly	Lys	Met	Leu	Ser	Glu	Thr	Gly	Leu
				35				40				45			

Ile	Thr	Phe	Asp	Pro	Gly	Tyr	Val	Ser	Thr	Gly	Ser	Thr	Glu	Ser	Lys
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

ES 2 382 363 T3

50	55	60
Ile Thr Tyr Ile Asp Gly Asp Ala Gly Ile Leu Arg Tyr Arg Gly Tyr		
65	70	75
Asp Ile Ala Asp Leu Ala Glu Asn Ala Thr Phe Asn Glu Val Ser Tyr		
85	90	95
Leu Leu Ile Asn Gly Glu Leu Pro Thr Pro Asp Glu Leu His Lys Phe		
100	105	110
Asn Asp Glu Ile Arg His His Thr Leu Leu Asp Glu Asp Phe Lys Ser		
115	120	125
Gln Phe Asn Val Phe Pro Arg Asp Ala His Pro Met Ala Thr Leu Ala		
130	135	140
Ser Ser Val Asn Ile Leu Ser Thr Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Asn Pro		
145	150	155
Leu Asp Glu Ala Gln Leu Asp Lys Ala Thr Val Arg Leu Met Ala Lys		
165	170	175
Val Pro Met Leu Ala Ala Tyr Ala His Arg Ala Arg Lys Gly Ala Pro		
180	185	190
Tyr Met Tyr Pro Asp Asn Ser Leu Asn Ala Arg Glu Asn Phe Leu Arg		
195	200	205
Met Met Phe Gly Tyr Pro Thr Glu Pro Tyr Glu Ile Asp Pro Ile Met		
210	215	220
Val Lys Ala Leu Asp Lys Leu Leu Ile Leu His Ala Asp His Glu Gln		
225	230	235
240		
Asn Cys Ser Thr Ser Thr Val Arg Met Ile Gly Ser Ala Gln Ala Asn		
245	250	255
Met Phe Val Ser Ile Ala Gly Gly Ile Asn Ala Leu Ser Gly Pro Leu		
260	265	270
His Gly Gly Ala Asn Gln Ala Val Leu Glu Met Leu Glu Asp Ile Lys		
275	280	285
Ser Asn His Gly Gly Asp Ala Thr Glu Phe Met Asn Lys Val Lys Asn		
290	295	300
Lys Glu Asp Gly Val Arg Leu Met Gly Phe Gly His Arg Val Tyr Lys		
305	310	315
Asn Tyr Asp Pro Arg Ala Ala Ile Val Lys Glu Thr Ala His Glu Ile		
325	330	335

ES 2 382 363 T3

Leu Glu His Leu Gly Gly Asp Asp Leu Leu Asp Leu Ala Ile Lys Leu
 340 345 350
 Glu Glu Ile Ala Leu Ala Asp Asp Tyr Phe Ile Ser Arg Lys Leu Tyr
 355 360 365
 Pro Asn Val Asp Phe Tyr Thr Gly Leu Ile Tyr Arg Ala Met Gly Phe
 370 375 380
 Pro Thr Asp Phe Phe Thr Val Leu Phe Ala Ile Gly Arg Leu Pro Gly
 385 390 395 400
 Trp Ile Ala His Tyr Arg Glu Gln Leu Gly Ala Ala Gly Asn Lys Ile
 405 410 415
 Asn Arg Pro Arg Gln Val Tyr Thr Gly Asn Glu Ser Arg Lys Leu Val
 420 425 430
 Pro Arg Glu Glu Arg
 435

- 5 <210> 9
 <211> 2814
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum
- 10 <220>
 <221> característica variada
 <222> (1)..(750)
 <223> secuencia situada corriente arriba de la secuencia codificadora
- 15 <220>
 <221> CDS
 <222> (751)..(2061)
 <223> alelo gltA
- 20 <220>
 <221> característica variada
 <222> (763)..(765)
 <223> n es a, c, g, ó t
- 25 <220>
 <221> característica variada
 <222> (2062)..(2814)
 <223> secuencia situada corriente arriba de la región codificadora
- <400> 9

agggcagggt ggggaagtgcg	gtcatgtctt	cgggcaactt	tctgcgccttg	gaagtaaaag	60
ggccaggat cgttaacgt	ctgacccaac	aactataacc	ctgaagctgt	cagttcctag	120
cacccttagat	tcttcacgca	gtctccaaa	cgataaaaaa	cgcacaaac	180
gaactattga	aaacgcgggg	attagttgac	cagccaccaa	tttggggta	240
ttgcaaagtt	ttcaatttct	aggttgttaa	tatcccctga	ggttgcgtta	300
aattgcatgg	ggaaagctac	tcggcaccca	tccttgcgc	gtgcatcaca	360

ES 2 382 363 T3

aactgtgcac cagtcactt attgtggat tttaatgcc ttaaaggcca gcatttcac	420
cctctagcg gggtgaatgc tggcccttag ggtgcagaac taaatagcag cacatcgca	480
caattgatct gagttctatt ggcgtgaccg tggctactga ttacggtggc tgggggttgt	540
cgggaatgtat gtaaccaacg tgattgtggg ggaattggct ctcacttcgg atatggctaa	600
accgcattta tcggtatagc gtgttaaccc gaccagattt gggaaagaat gtgtcgagta	660
acaaaaactg acatgcgctt ggcgcatccc agttggtaag aataaacggg actacttccg	720
taatccggaa gagttttttt ccgaacaaat atg ttt gaa agg nnn atc gtg gct	774
Met Phe Glu Arg Xaa Ile Val Ala	
1 5	
act gat aac aac aag gct gtc ctg cac tac ccc ggt ggc gag ttc gaa	822
Thr Asp Asn Asn Lys Ala Val Leu His Tyr Pro Gly Gly Glu Phe Glu	
10 15 20	
atg gac atc atc gag gct tct gag ggt aac aac ggt gtt gtc ctg ggc	870
Met Asp Ile Ile Glu Ala Ser Glu Gly Asn Asn Gly Val Val Leu Gly	
25 30 35 40	
aag atg ctg tct gag act gga ctg atc act ttt gac cca ggt tat gtg	918
Lys Met Leu Ser Glu Thr Gly Leu Ile Thr Phe Asp Pro Gly Tyr Val	
45 50 55	
agc act ggc tcc acc gag tcg aag atc acc tac atc gat ggc gat gcg	966
Ser Thr Gly Ser Thr Glu Ser Lys Ile Thr Tyr Ile Asp Gly Asp Ala	
60 65 70	
gga atc ctg cgt tac cgc ggc tat gac atc gct gat ctg gct gag aat	1014
Gly Ile Leu Arg Tyr Arg Gly Tyr Asp Ile Ala Asp Leu Ala Glu Asn	
75 80 85	
gcc acc ttc aac gag gtt tct tac cta ctt atc aac ggt gag cta cca	1062
Ala Thr Phe Asn Glu Val Ser Tyr Leu Leu Ile Asn Gly Glu Leu Pro	
90 95 100	
acc cca gat gag ctt cac aag ttt aac gac gag att cgc cac cac acc	1110
Thr Pro Asp Glu Leu His Lys Phe Asn Asp Glu Ile Arg His His Thr	
105 110 115 120	
ctt ctg gac gag gac ttc aag tcc cag ttc aac gtg ttc cca cgc gac	1158
Leu Leu Asp Glu Asp Phe Lys Ser Gln Phe Asn Val Phe Pro Arg Asp	
125 130 135	
gct cac cca atg gca acc ttg gct tcc tcg gtt aac att ttg tct acc	1206
Ala His Pro Met Ala Thr Leu Ala Ser Ser Val Asn Ile Leu Ser Thr	
140 145 150	
tac tac cag gac cag ctg aac cca ctc gat gag gca cag ctt gat aag	1254
Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Asn Pro Leu Asp Glu Ala Gln Leu Asp Lys	
155 160 165	
gca acc gtt cgc ctc atg gca aag gtt cca atg ctg gct gcg tac gca	1302
Ala Thr Val Arg Leu Met Ala Lys Val Pro Met Leu Ala Ala Tyr Ala	
170 175 180	
cac cgc gca cgc aag ggt gct cct tac atg tac cca gac aac tcc ctc	1350
His Arg Ala Arg Lys Gly Ala Pro Tyr Met Tyr Pro Asp Asn Ser Leu	
185 190 195 200	
aat gcg cgt gag aac ttc ctg cgc atg atg ttc ggt tac cca acc gag	1398
Asn Ala Arg Glu Asn Phe Leu Arg Met Met Phe Gly Tyr Pro Thr Glu	
205 210 215	
cca tac gag atc gac cca atc atg gtc aag gct ctg gac aag ctg ctc	1446

ES 2 382 363 T3

Pro Tyr Glu Ile Asp Pro Ile Met Val Lys Ala Leu Asp Lys Leu Leu	
220 225 230	
atc ctg cac gct gac cac gag cag aac tgc tcc acc tcc acc gtt cgt Ile Leu His Ala Asp His Glu Gln Asn Cys Ser Thr Ser Thr Val Arg	1494
235 240 245	
atg atc ggt tcc gca cag gcc aac atg ttt gtc tcc atc gct ggt ggc Met Ile Gly Ser Ala Gln Ala Asn Met Phe Val Ser Ile Ala Gly Gly	1542
250 255 260	
atc aac gct ctg tcc ggc cca ctg cac ggt ggc gca aac cag gct gtt Ile Asn Ala Leu Ser Gly Pro Leu His Gly Ala Asn Gln Ala Val	1590
265 270 275 280	
ctg gag atg ctc gaa gac atc aag agc aac cac ggt ggc gac gca acc Leu Glu Met Leu Glu Asp Ile Lys Ser Asn His Gly Gly Asp Ala Thr	1638
285 290 295	
gag ttc atg aac aag gtc aag aac aag gaa gac ggc gtc cgc ctc atg Glu Phe Met Asn Lys Val Lys Asn Lys Glu Asp Gly Val Arg Leu Met	1686
300 305 310	
ggc ttc gga cac cgc gtt tac aag aac tac gat cca cgt gca gca atc Gly Phe Gly His Arg Val Tyr Lys Asn Tyr Asp Pro Arg Ala Ala Ile	1734
315 320 325	
gtc aag gag acc gca cac gag atc ctc gag cac ctc ggt ggc gac gat Val Lys Glu Thr Ala His Glu Ile Leu Glu His Leu Gly Gly Asp Asp	1782
330 335 340	
ctt ctg gat ctg gca atc aag ctg gaa gaa att gca ctg gct gat gat Leu Leu Asp Leu Ala Ile Lys Leu Glu Ile Ala Leu Ala Asp Asp	1830
345 350 355 360	
tac ttc atc tcc cgc aag ctc tac ccg aac gta gac ttc tac acc ggc Tyr Phe Ile Ser Arg Lys Leu Tyr Pro Asn Val Asp Phe Tyr Thr Gly	1878
365 370 375	
ctg atc tac cgc gca atg ggc ttc cca act gac ttc ttc acc gta ttg Leu Ile Tyr Arg Ala Met Gly Phe Pro Thr Asp Phe Phe Thr Val Leu	1926
380 385 390	
ttc gca atc ggt cgt ctg cca gga tgg atc gct cac tac cgc gag cag Phe Ala Ile Gly Arg Leu Pro Gly Trp Ile Ala His Tyr Arg Glu Gln	1974
395 400 405	
ctc ggt gca gca ggc aac aag atc aac cgc cca cgc cag gtc tac acc Leu Gly Ala Ala Gly Asn Lys Ile Asn Arg Pro Arg Gln Val Tyr Thr	2022
410 415 420	
ggc aac gaa tcc cgc aag ttg gtt cct cgc gag gag cgc taaatttgc Gly Asn Glu Ser Arg Lys Leu Val Pro Arg Glu Glu Arg	2071
425 430 435	
ggatgattct cgttcaactt cggccgaagc cacttcgtct gtcataatga cagggatgg ttcggccgtt tttgcatgaa accaaaaat acgattttca aggagcatgt acagcacatg	2131
gaaaagccac agattgagct accggcgtt ccagcaccgg aagatctcgt aatctctgac	2191
atcatcggt gcgaggagc agaagccccgc ccagggtggag aagttgaggt ccactatgtg	2251
ggcggtgact ttgaaaccgg cgaggagttt gactttcct gggatcgtgg acagaccagc	2311
cagttcccac tcaacggcct cattgcgaggt tggcaagagg gaattccagg catgaaggc	2371
ggcggacgac gtcagctgac cattccgcca gaggctgctt acggccctga gggttccggc	2431
	2491

cacccactgt	ctggccgtac	cctgggttac	atcatcgatt	tgatcagcgc	ataattttct	2551
ttactgcgct	aaacgctcaa	atcggtgaa	gcgactgtcg	cgtcccgccc	tctccggatt	2611
gttatccaat	tcggagaggg	cgttgctgat	tgtgccgaga	atttcttcaa	caaagtgctc	2671
ggtttcggcg	acgatcccg	cgataagccc	ttggcttaaa	agtgcgtgcg	cctgcacgcc	2731
ttgtcgctct	atgatttccg	cggcgtggtt	ggtgtcgcgg	aagaggatgg	ccgaggcgcc	2791
ctctggtggc	aatgcggaca	gcc				2814

<210> 10

<211> 437

5 <212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> característica variada

10 <222> (5)..(5)

<223> el "Xaa" en el lugar 5 representa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, ó Phe.

<400> 10

15

Met	Phe	Glu	Arg	Xaa	Ile	Val	Ala	Thr	Asp	Asn	Asn	Lys	Ala	Val	Leu
1				5					10			15			

His	Tyr	Pro	Gly	Gly	Glu	Phe	Glu	Met	Asp	Ile	Ile	Glu	Ala	Ser	Glu
						20		25				30			

Gly	Asn	Asn	Gly	Val	Val	Leu	Gly	Lys	Met	Leu	Ser	Glu	Thr	Gly	Leu
				35			40					45			

Ile	Thr	Phe	Asp	Pro	Gly	Tyr	Val	Ser	Thr	Gly	Ser	Thr	Glu	Ser	Lys
				50		55			60						

Ile	Thr	Tyr	Ile	Asp	Gly	Asp	Ala	Gly	Ile	Leu	Arg	Tyr	Arg	Gly	Tyr
				65		70			75			80			

Asp	Ile	Ala	Asp	Leu	Ala	Glu	Asn	Ala	Thr	Phe	Asn	Glu	Val	Ser	Tyr
				85			90			95					

Leu	Leu	Ile	Asn	Gly	Glu	Leu	Pro	Thr	Pro	Asp	Glu	Leu	His	Lys	Phe
				100			105					110			

Asn	Asp	Glu	Ile	Arg	His	His	Thr	Leu	Leu	Asp	Glu	Asp	Phe	Lys	Ser
				115		120						125			

Gln	Phe	Asn	Val	Phe	Pro	Arg	Asp	Ala	His	Pro	Met	Ala	Thr	Leu	Ala
				130		135					140				

Ser	Ser	Val	Asn	Ile	Leu	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Gln	Asp	Gln	Leu	Asn	Pro
				145		150			155			160			

Leu	Asp	Glu	Ala	Gln	Leu	Asp	Lys	Ala	Thr	Val	Arg	Leu	Met	Ala	Lys
				165			170					175			

val Pro Met Leu Ala Ala Tyr Ala His Arg Ala Arg Lys Gly Ala Pro
 180 185 190
 Tyr Met Tyr Pro Asp Asn Ser Leu Asn Ala Arg Glu Asn Phe Leu Arg
 195 200 205
 Met Met Phe Gly Tyr Pro Thr Glu Pro Tyr Glu Ile Asp Pro Ile Met
 210 215 220
 val Lys Ala Leu Asp Lys Leu Leu Ile Leu His Ala Asp His Glu Gln
 225 230 235 240
 Asn Cys Ser Thr Ser Thr Val Arg Met Ile Gly Ser Ala Gln Ala Asn
 245 250 255
 Met Phe val Ser Ile Ala Gly Gly Ile Asn Ala Leu Ser Gly Pro Leu
 260 265 270
 His Gly Gly Ala Asn Gln Ala Val Leu Glu Met Leu Glu Asp Ile Lys
 275 280 285
 Ser Asn His Gly Gly Asp Ala Thr Glu Phe Met Asn Lys Val Lys Asn
 290 295 300
 Lys Glu Asp Gly Val Arg Leu Met Gly Phe Gly His Arg Val Tyr Lys
 305 310 315 320
 Asn Tyr Asp Pro Arg Ala Ala Ile Val Lys Glu Thr Ala His Glu Ile
 325 330 335
 Leu Glu His Leu Gly Gly Asp Asp Leu Leu Asp Leu Ala Ile Lys Leu
 340 345 350
 Glu Glu Ile Ala Leu Ala Asp Asp Tyr Phe Ile Ser Arg Lys Leu Tyr
 355 360 365
 Pro Asn Val Asp Phe Tyr Thr Gly Leu Ile Tyr Arg Ala Met Gly Phe
 370 375 380
 Pro Thr Asp Phe Phe Thr Val Leu Phe Ala Ile Gly Arg Leu Pro Gly
 385 390 395 400
 Trp Ile Ala His Tyr Arg Glu Gln Leu Gly Ala Ala Gly Asn Lys Ile
 405 410 415
 Asn Arg Pro Arg Gln Val Tyr Thr Gly Asn Glu Ser Arg Lys Leu Val
 420 425 430
 Pro Arg Glu Glu Arg
 435

<210> 11
 <211> 105
 5 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <221> CDS
 <222> (40)..(105)

5 <220>
 <221> característica variada
 <222> (52)..(54)
 <223> n es a, c, g, ó t
 <400> 11

10

ctacttccgt aatccggaag agtttttttc cgaacaaat atg ttt gaa agg nnn	54
Met Phe Glu Arg Xaa	5
1	5

 atc gtc gct act gat aac aac aag gct gtc ctg cac tac ccc ggt ggc
 Ile Val Ala Thr Asp Asn Asn Lys Ala Val Leu His Tyr Pro Gly Gly
 10 15 20

gag
 Glu

15 <210> 12
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

20 <220>
 <221> característica variada
 <222> (5)..(5)
 <223> el "Xaa" en el lugar 5 representa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, ó Phe.

<400> 12

Met Phe Glu Arg Xaa Ile Val Ala Thr Asp Asn Asn Lys Ala Val Leu	10
1 S 10 15	

 His Tyr Pro Gly Gly Glu
 20

25 <210> 13
 <211> 206
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

30 <220>
 <221> CDS
 <222> (90)..(206)

<220>
 <221> característica variada
 <222> (102)..(104)
 <223> n es a, c, g, ó t

<400> 13

40

caaaaactga catgcgcttg gcgcatccca gttggtaaga ataaacggga ctacttccgt 60

aatccggaag agttttttc cgaacaaat atg ttt gaa agg nnn atc gtg gct 113
 Met Phe Glu Arg Xaa Ile Val Ala
 1 5

act gat aac aac aag gct gtc ctg cac tac ccc ggt ggc gag ttc gaa 161
 Thr Asp Asn Asn Lys Ala Val Leu His Tyr Pro Gly Gly Glu Phe Glu
 10 15 20

atg gac atc atc gag gct tct gag ggt aac aac ggt gtt gtc ctg 206
 Met Asp Ile Ile Glu Ala Ser Glu Gly Asn Asn Gly Val Val Leu
 25 30 35

<210> 14

<211> 39

<212> PRT

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> característica variada

<222> (5)..(5)

10 <223> el "Xaa" en el lugar 5 representa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, or Phe.

<400> 14

Met Phe Glu Arg Xaa Ile Val Ala Thr Asp Asn Asn Lys Ala Val Leu
 1 5 10 15

His Tyr Pro Gly Gly Glu Phe Glu Met Asp Ile Ile Glu Ala Ser Glu
 20 25 30

Gly Asn Asn Gly Val Val Leu
 35

15

<210> 15

<211> 405

<212> ADN

20 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (190)..(405)

25

<220>

<221> característica variada

<222> (202)..(204)

30

<223> n es a, c, g, ó t

<400> 15

gattgtgggg gaattggctc tcacttcgga tatggctaaa ccgcatttat cggtagcgt	60
tgttaaccgg accagattgg gaaagaaaatg tgtcgagtaa caaaaactga catgcgcttg	120
gcgcatccca gttggtaaga ataaacggga ctactccgt aatccgaaag agttttttc	180
cgaacaaat atg ttt gaa agg nnn atc gtg gct act gat aac aac aag gct Met Phe Glu Arg Xaa Ile Val Ala Thr Asp Asn Asn Lys Ala	231
1 5 10	
gtc ctg cac tac ccc ggt ggc gag ttc gaa atg gac atc atc gag gct Val Leu His Tyr Pro Gly Gly Glu Phe Glu Met Asp Ile Ile Glu Ala	279
15 20 25 30	

tct gag ggt aac aac ggt gtt gtc ctg ggc aag atg ctg tct gag act Ser Glu Gly Asn Asn Gly Val Val Leu Gly Lys Met Leu Ser Glu Thr	327
35 40 45	
gga ctg atc act ttt gac cca ggt tat gtg agc act ggc tcc acc gag Gly Leu Ile Thr Phe Asp Pro Gly Tyr Val Ser Thr Gly Ser Thr Glu	375
50 55 60	
tcg aag atc acc tac atc gat ggc gat gcg Ser Lys Ile Thr Tyr Ile Asp Gly Asp Ala	405
65 70	

<210> 16

<211> 72

5 <212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> característica variada

10 <222> (5)..(5)

<223> el "Xaa" en el lugar 5 representa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, ó Phe.

15 <400> 16

15

Met Phe Glu Arg Xaa Ile Val Ala Thr Asp Asn Asn Lys Ala Val Leu
1 5 10 15

His Tyr Pro Gly Gly Glu Phe Glu Met Asp Ile Ile Glu Ala Ser Glu
20 25 30

Gly Asn Asn Gly Val Val Leu Gly Lys Met Leu Ser Glu Thr Gly Leu
35 40 45

Ile Thr Phe Asp Pro Gly Tyr Val Ser Thr Gly Ser Thr Glu Ser Lys
50 55 60

Ile Thr Tyr Ile Asp Gly Asp Ala
65 70

<210> 17

<211> 1001

20 <212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

25 <222> (489)..(1001)

<220>

<221> característica variada

ES 2 382 363 T3

<222> (501)..(503)
<223> n es a, c, g, ó t

<400> 17

5

ttgttataaata tccccctgagg ttgcgttataa gggtggcgaa ttgcgttgggg aaagctactc ggcacccatc cttgtcgctg gcatcacaaa ctttgcctaaa ctgtgcacca gtccacttat tgtgggattt ttaatgcctt aaaggccagc attttacccc tctagcgggg ttgaatgcgtg	60 120 180
gccttgaggg tgcagaacta aatagcagca catcggcaca attgatctga gttctattgg cgtgaccgtg gctactgatt acggtggtcg tgggtggctg ggaatgtatgt aaccacgtg attgtgggg aattggctct cacttcggat atggctaaac cgcatttac ggtatagcgt gttaaccgga ccagattggg aaagaaatgt gtcgagtaac aaaaactgac atgcgttgg cgcatccag ttggtaagaa taaacgggac tacttccgtatccggaaga gttttttcc gaacaaat atg ttt gaa agg nnn atc gtc gct act gat aac aac aag gct Met Phe Glu Arg Xaa Ile Val Ala Thr Asp Asn Asn Lys Ala 1 5 10	240 300 360 420 480 530
gtc ctg cac tac ccc ggt ggc gag ttc gaa atg gac atc atc gag gct Val Leu His Tyr Pro Gly Gly Glu Phe Glu Met Asp Ile Ile Glu Ala 15 20 25 30	578
tct gag ggt aac aac ggt gtt gtc ctg ggc aag atg ctg tct gag act Ser Glu Gly Asn Asn Gly Val Val Leu Gly Lys Met Leu Ser Glu Thr 35 40 45	626
gga ctg atc act ttt gac cca ggt tat gtc agc act ggc tcc acc gag Gly Leu Ile Thr Phe Asp Pro Gly Tyr Val Ser Thr Gly Ser Thr Glu 50 55 60	674
tcg aag atc acc tac atc gat ggc gat gcg gga atc ctg cgt tac cgc Ser Lys Ile Thr Tyr Ile Asp Gly Asp Ala Gly Ile Leu Arg Tyr Arg 65 70 75	722
ggc tat gac atc gct gat ctg gct gag aat gcc acc ttc aac gag gtt Gly Tyr Asp Ile Ala Asp Leu Ala Glu Asn Ala Thr Phe Asn Glu Val 80 85 90	770
tct tac cta ctt atc aac ggt gag cta cca acc cca gat gag ctt cac Ser Tyr Leu Leu Ile Asn Gly Glu Leu Pro Thr Pro Asp Glu Leu His 95 100 105 110	818
aag ttt aac gac gag att cgc cac cac acc ctt ctg gac gag gac ttc Lys Phe Asn Asp Glu Ile Arg His His Thr Leu Leu Asp Glu Asp Phe 115 120 125	866
aag tcc cag ttc aac gtc ttc cca cgc gac gct cac cca atg gca acc Lys Ser Gln Phe Asn Val Phe Pro Arg Asp Ala His Pro Met Ala Thr 130 135 140	914
ttg gct tcc tcg gtt aac att ttg tct acc tac tac cag gac cag ctg Leu Ala Ser Ser Val Asn Ile Leu Ser Thr Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu 145 150 155	962
aac cca ctc gat gag gca cag ctt gat aag gca acc gtt Asn Pro Leu Asp Glu Ala Gln Leu Asp Lys Ala Thr Val 160 165 170	1001

<210> 18

<211> 171

<212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>

15 <221> característica variada
<222> (5)..(5)

ES 2 382 363 T3

<223> el "Xaa" en el lugar 5 representa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, ó Phe.

<400> 18

5

Met Phe Glu Arg Xaa Ile Val Ala Thr Asp Asn Asn Lys Ala Val Leu
1 5 10 15

His Tyr Pro Gly Gly Glu Phe Met Asp Ile Ile Glu Ala Ser Glu
20 25 30

Gly Asn Asn Gly Val Val Leu Gly Lys Met Leu Ser Glu Thr Gly Leu
35 40 45

Ile Thr Phe Asp Pro Gly Tyr Val Ser Thr Gly Ser Thr Glu Ser Lys
50 55 60

Ile Thr Tyr Ile Asp Gly Asp Ala Gly Ile Leu Arg Tyr Arg Gly Tyr
65 70 75 80

Asp Ile Ala Asp Leu Ala Glu Asn Ala Thr Phe Asn Glu Val Ser Tyr
85 90 95

Leu Leu Ile Asn Gly Glu Leu Pro Thr Pro Asp Glu Leu His Lys Phe
100 105 110

Asn Asp Glu Ile Arg His His Thr Leu Leu Asp Glu Asp Phe Lys Ser
115 120 125

Gln Phe Asn Val Phe Pro Arg Asp Ala His Pro Met Ala Thr Leu Ala
130 135 140

Ser Ser Val Asn Ile Leu Ser Thr Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Asn Pro
145 150 155 160

Leu Asp Glu Ala Gln Leu Asp Lys Ala Thr Val
165 170

<210> 19

<211> 1263

10 <212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

15 <221> CDS

<222> (1)..(1263)

<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
Val 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 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

ES 2 382 363 T3

gaa ctt cta gaa ctt gca gcg gca gtg aat ccc gtt ccg cca gct cgt Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg 50 55 60	192
gaa atg gat atg ctc ctg act gct ggt gag cgt att tct aac gct ctc Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu 65 70 75 80	240
gtc gcc atg gct att gag tcc ctt ggc gca gaa gcc caa tct ttc acg Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr 85 90 95	288
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 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 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	1008

ES 2 382 363 T3

Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr	
325 330 335	
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	
gac 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 gac gaa gac gcc gtc gtt tat	1248
Leu His Glu Gln Phe Gln Leu 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

5 <212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 20

Val 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 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	
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
 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
 420

5 <210> 21
 <211> 2266
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum
 10 <220>
 <221> característica variada
 <222> (1)..(500)
 <223> secuencia situada corriente arriba de la secuencia codificadora
 15 <220>
 <221> CDS
 <222> (501)..(1763)
 <223> región codificadora del gen lysC de tipo silvestre
 20 <220>
 <221> característica variada
 <222> (1764)..(2266)
 <223> secuencia de nucleótidos situada corriente abajo de la región codificadora
 <400> 21

cgacaggaca	agcactgggt	gcactaccaa	gagggtgccg	aaaccaagtg	ctactgtttg	60
taagaaatat	gccagcatcg	cgtactcatg	cctgcccacc	acatcggtgt	catcagagca	120
tttagttaaag	gtgagctcct	tagggagcca	tcttttgggg	tgcggagcgc	gatccgggt	180
ctgaccacgg	tgccccatgc	gattgttaat	gccgatgcta	gggcgaaaag	cacggcgagc	240
agattgttt	gcacttgatt	caggtagtt	gactaaagag	ttgctcgcga	agtagcacct	300
gtcactttt	tctcaaataat	taaatcgaat	atcaatataat	ggtctgttta	ttggaacgcg	360
tcccagtggc	tgagacgcat	ccgctaaagc	cccaggaacc	ctgtgcagaa	agaaaacact	420
cctctggcta	ggtagacaca	gtttataaag	gttagagttga	gcgggtaact	gtcagcacgt	480
agatcgaaaag	gtgcacaaag	gtg	gcc	ctg	gtc	533
		Met	Ala	Leu	Val	
		1	5	5	10	
tcg	ctt	gag	agt	gct	gaa	581
Ser	Leu	Glu	Ser	Ala	Glu	
15	20	25				
gcc	acc	aag	aag	gct	gga	629
Ala	Thr	Lys	Lys	Ala	Gly	
30	35	40				
gga	gac	acc	acg	gat	gaa	677
Gly	Asp	Thr	Thr	Asp	Glu	
45	50	55				
gtt	ccg	cca	gct	cgt	gaa	725
Val	Pro	Pro	Ala	Arg	Glu	
60	65	70	75			
att	tct	aac	gct	ctc	gcc	773
Ile	Ser	Asn	Ala	Leu	Val	
80	85	90				
gcc	caa	tct	ttc	acg	ggc	821
Ala	Gln	Ser	Phe	Thr	Gly	

ES 2 382 363 T3

95	100	105	
cac gga aac gca cgc att gtt gat gtc act cca ggt cgt gtg cgt gaa His Gly Asn Ala Arg Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu 110 115 120			869
gca ctc gat gag ggc aag atc tgc att gtt gct ggt ttc cag ggt gtt Ala Leu Asp Glu Gly Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val 125 130 135			917
aat aaa gaa acc cgc gat gtc acc acg ttg ggt cgt ggt ggt tct gac Asn Lys Glu Thr Arg Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Ser Asp 140 145 150 155			965
acc act gca gtt gcg ttg gca gct gct ttg aac gct gat gtg tgt gag Thr Thr Ala Val Ala Leu Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu 160 165 170			1013
att tac tcg gac gtt gac ggt gtg tat acc gct gac ccg cgc atc gtt Ile Tyr Ser Asp Val Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val 175 180 185			1061
cct aat gca cag aag ctg gaa aag ctc agc ttc gaa gaa atg ctg gaa Pro Asn Ala Gln Lys Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu 190 195 200			1109
ctt gct gct gtt ggc tcc aag att ttg gtg ctg cgc agt gtt gaa tac Leu Ala Ala Val Gly Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr 205 210 215			1157
gct cgt gca ttc aat gtg cca ctt cgc gta cgc tcg tct tat agt aat Ala Arg Ala Phe Asn Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn 220 225 230 235			1205
gat ccc ggc act ttg att gcc ggc tct atg gag gat att cct gtg gaa Asp Pro Gly Thr Leu Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu 240 245 250			1253
gaa gca gtc ctt acc ggt gtc gca acc gac aag tcc gaa gcc aaa gta Glu Ala Val Leu Thr Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val 255 260 265			1301
acc gtt ctg ggt att tcc gat aag cca ggc gag gct gcg aag gtt ttc Thr Val Leu Gly Ile Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe 270 275 280			1349
cgt gcg ttg gct gat gca gaa atc aac att gac atg gtt ctg cag aac Arg Ala Leu Ala Asp Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn 285 290 295			1397
gtc tct tct gta gaa gac ggc acc acc gac atc acc ttc acc tgc cct Val Ser Ser Val Glu Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro 300 305 310 315			1445
cgt tcc gac ggc cgc cgc gcg atg gag atc ttg aag aag ctt cag gtt Arg Ser Asp Gly Arg Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val 320 325 330			1493
cag ggc aac tgg acc aat gtg ctt tac gac gac cag gtc ggc aaa gtc Gln Gly Asn Trp Thr Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val 335 340 345			1541
tcc ctc gtg ggt gct ggc atg aag tct cac cca ggt gtt acc gca gag Ser Leu Val Gly Ala Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu 350 355 360			1589
ttc atg gaa gct ctg cgc gat gtc aac gtg aac atc gaa ttg att tcc Phe Met Glu Ala Leu Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser 365 370 375			1637

acc tct gag att cgt att tcc gtg ctg atc cgt gaa gat gat ctg gat	1685
Thr Ser Glu Ile Arg Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp	
380 385 390 395	
gct gct gca cgt gca ttg cat gag cag ttc cag ctg ggc ggc gaa gac	1733
Ala Ala Ala Arg Ala Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp	
400 405 410	
gaa gcc gtc gtt tat gca ggc acc gga cgc taaagttta aaggagtagt	1783
Glu Ala Val Val Tyr Ala Gly Thr Gly Arg	
415 420	
tttacaatga ccaccatcgc agttgttgtt gcaaccggcc aggtcggcca ggttatgcgc	1843
accctttgg aagagcgcaa tttccagct gacactgttc gtttcttgc ttccccacgt	1903
tccgcaggcc gtaagattga attccgtggc acggaaatcg aggtagaaga cattactcg	1963
gcaaccgagg agtccctcaa ggacatcgac gttgcgttgt tctccgctgg aggcaccgct	2023
tccaaggagt acgctccact gttcgtgtct gcaggcgcga ctgttgtgga taactttct	2083
gcttggcgca aggacgacga ggttccacta atcgtctctg aggtgaaccc ttccgacaag	2143
gattccctgg tcaagggcat tattgcgaac cctaactgca ccaccatggc tgcgatgcca	2203
gtgctgaagc cacttcacga tgccgcttgtt cttgtaaagc ttcacgtttc ctcttaccag	2263
gct	2266

5 <210> 22
 <211> 421
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum
 <400> 22

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 2 382 363 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 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
 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
 420

<210> 23
 <211> 1503
 <212> ADN
 5 <213> Corynebacterium glutamicum
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1500)
 10 <223> gen mqo de tipo silvestre
 <400> 23

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

ES 2 382 363 T3

cag acc aag cag tac ctg gat gca gct gaa gtt gaa ggc act gaa atc Gln Thr Lys Gln Tyr Leu Asp Ala Ala Glu Val Glu Gly Thr Glu Ile 195 200 205	624
cgc tat ggc cac gaa gtc aag agc atc aag gct gat ggc gca aag tgg Arg Tyr Gly His Glu Val Lys Ser Ile Lys Ala Asp Gly Ala Lys Trp 210 215 220	672
atc gtg acc gtc aag aac gta cac act ggc gac acc aag acc atc aag Ile Val Thr Val Lys Asn Val His Thr Gly Asp Thr Lys Thr Ile Lys 225 230 235 240	720
gca aac ttc gtg ttc gtc ggc gca ggc gga tac gca ctg gat ctg ctt Ala Asn Phe Val Phe Val Gly Ala Gly Tyr Ala Leu Asp Leu Leu 245 250 255	768
cgc agc gca ggc atc cca cag gtc aag ggc ttc gct gga ttc cca gta Arg Ser Ala Gly Ile Pro Gln Val Lys Gly Phe Ala Gly Phe Pro Val 260 265 270	816
tcc ggc ctg tgg ctt cgt tgc acc aac gag gaa ctg atc gag cag cac Ser Gly Leu Trp Leu Arg Cys Thr Asn Glu Glu Leu Ile Glu Gln His 275 280 285	864
gca gcc aag gta tat ggc aag gca tct gtt ggc gct cct cca atg tct Ala Ala Lys Val Tyr Gly Lys Ala Ser Val Gly Ala Pro Pro Met Ser 290 295 300	912
gtt cct cac ctt gac acc cgc gtt atc gag ggt gaa aag ggt ctg ctc Val Pro His Leu Asp Thr Arg Val Ile Glu Gly Glu Lys Gly Leu Leu 305 310 315 320	960
ttt gga cct tac ggt ggc tgg acc cct aag ttc ttg aag gaa ggc tcc Phe Gly Pro Tyr Gly Gly Trp Thr Pro Lys Phe Leu Lys Glu Gly Ser 325 330 335	1008
tac ctg gac ctg ttc aag tcc atc cgc cca gac aac att cct tcc tac Tyr Leu Asp Leu Phe Lys Ser Ile Arg Pro Asp Asn Ile Pro Ser Tyr 340 345 350	1056
ctt ggc gtt gct gct cag gaa ttt gat ctg acc aag tac ctt gtc act Leu Gly Val Ala Ala Gln Glu Phe Asp Leu Thr Lys Tyr Leu Val Thr 355 360 365	1104
gaa gtt ctc aag gac cag gac aag cgt atg gat gct ctt cgc gag tac Glu Val Leu Lys Asp Gln Asp Lys Arg Met Asp Ala Leu Arg Glu Tyr 370 375 380	1152
atg cca gag gca caa aac ggc gat tgg gag acc atc gtt gcc gga cag Met Pro Glu Ala Gln Asn Gly Asp Trp Glu Thr Ile Val Ala Gly Gln 385 390 395 400	1200
cgt gtt cag gtt att aag cct gca gga ttc cct aag ttc ggt tcc ctg Arg Val Gln Val Ile Lys Pro Ala Gly Phe Pro Lys Phe Gly Ser Leu 405 410 415	1248
gaa ttc ggc acc acc ttg atc aac aac tcc gaa ggc acc atc gcc gga Glu Phe Gly Thr Thr Leu Ile Asn Asn Ser Glu Gly Thr Ile Ala Gly 420 425 430	1296
ttg ctc ggt gct tcc cct gga gca tcc atc gca cct tcc gca atg atc Leu Leu Gly Ala Ser Pro Gly Ala Ser Ile Ala Pro Ser Ala Met Ile 435 440 445	1344
gag ctg ctt gag cgt tgc ttc ggt gac cgc atg atc gag tgg ggc gac Glu Leu Leu Glu Arg Cys Phe Gly Asp Arg Met Ile Glu Trp Gly Asp 450 455 460	1392
aag ctg aag gac atg atc cct tcc tac ggc aag aag ctt gct tcc gag	1440

Lys	Leu	Lys	Asp	Met	Ile	Pro	Ser	Tyr	Gly	Lys	Lys	Leu	Ala	Ser	Glu	
465					470				475						480	
cca	gca	ctg	ttt	gag	cag	cag	tgg	gca	cgc	acc	cag	aag	acc	ctg	aag	1488
Pro	Ala	Leu	Phe	Glu	Gln	Gln	Trp	Ala	Arg	Thr	Gln	Lys	Thr	Leu	Lys	
															495	
485									490							
ctt	gag	gaa	gcc	taa												1503
Leu	Glu	Glu	Ala													
			500													

<210> 24

<211> 500

5 <212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 24

Met	Ser	Asp	Ser	Pro	Lys	Asn	Ala	Pro	Arg	Ile	Thr	Asp	Glu	Ala	Asp	
1				5					10				15			
val	val	Leu	Ile	Gly	Ala	Gly	Ile	Met	Ser	Ser	Thr	Leu	Gly	Ala	Met	
								20			25		30			
Leu	Arg	Gln	Leu	Glu	Pro	Ser	Trp	Thr	Gln	Ile	Val	Phe	Glu	Arg	Leu	
					35				40			45				
Asp	Gly	Pro	Ala	Gln	Glu	Ser	Ser	Ser	Pro	Trp	Asn	Asn	Ala	Gly	Thr	
					50				55			60				
Gly	His	Ser	Ala	Leu	Cys	Glu	Leu	Asn	Tyr	Thr	Pro	Glu	Val	Gly		
					65			70		75		80				
Lys	Val	Glu	Ile	Ala	Lys	Ala	Val	Gly	Ile	Asn	Glu	Lys	Phe	Gln	Val	
					85			90			95					
Ser	Arg	Gln	Phe	Trp	Ser	His	Leu	Val	Glu	Glu	Gly	Val	Leu	Ser	Asp	
					100			105			110					
Pro	Lys	Glu	Phe	Ile	Asn	Pro	Val	Pro	His	Val	Ser	Phe	Gly	Gln	Gly	
					115			120			125					
Ala	Asp	Gln	Val	Ala	Tyr	Ile	Lys	Ala	Arg	Tyr	Glu	Ala	Leu	Lys	Asp	
					130			135			140					
His	Pro	Leu	Phe	Gln	Gly	Met	Thr	Tyr	Ala	Asp	Asp	Glu	Ala	Thr	Phe	
					145			150			155			160		
Thr	Glu	Lys	Leu	Pro	Leu	Met	Ala	Lys	Gly	Arg	Asp	Phe	Ser	Asp	Pro	
					165				170			175				
Val	Ala	Ile	Ser	Trp	Ile	Asp	Glu	Gly	Thr	Asp	Ile	Asn	Tyr	Gly	Ala	
					180			185			190					
Gln	Thr	Lys	Gln	Tyr	Leu	Asp	Ala	Ala	Glu	Val	Glu	Gly	Thr	Glu	Ile	
					195			200			205					

ES 2 382 363 T3

Arg Tyr Gly His Glu Val Lys Ser Ile Lys Ala Asp Gly Ala Lys Trp
 210 215 220
 Ile Val Thr Val Lys Asn Val His Thr Gly Asp Thr Lys Thr Ile Lys
 225 230 235 240
 Ala Asn Phe Val Phe Val Gly Ala Gly Gly Tyr Ala Leu Asp Leu Leu
 245 250 255
 Arg Ser Ala Gly Ile Pro Gln Val Lys Gly Phe Ala Gly Phe Pro Val
 260 265 270
 Ser Gly Leu Trp Leu Arg Cys Thr Asn Glu Glu Leu Ile Glu Gln His
 275 280 285
 Ala Ala Lys Val Tyr Gly Lys Ala Ser Val Gly Ala Pro Pro Met Ser
 290 295 300
 Val Pro His Leu Asp Thr Arg Val Ile Glu Gly Glu Lys Gly Leu Leu
 305 310 315 320
 Phe Gly Pro Tyr Gly Gly Trp Thr Pro Lys Phe Leu Lys Glu Gly Ser
 325 330 335
 Tyr Leu Asp Leu Phe Lys Ser Ile Arg Pro Asp Asn Ile Pro Ser Tyr
 340 345 350
 Leu Gly Val Ala Ala Gln Glu Phe Asp Leu Thr Lys Tyr Leu Val Thr
 355 360 365
 Glu Val Leu Lys Asp Gln Asp Lys Arg Met Asp Ala Leu Arg Glu Tyr
 370 375 380
 Met Pro Glu Ala Gln Asn Gly Asp Trp Glu Thr Ile Val Ala Gly Gln
 385 390 395 400
 Arg Val Gln Val Ile Lys Pro Ala Gly Phe Pro Lys Phe Gly Ser Leu
 405 410 415
 Glu Phe Gly Thr Thr Leu Ile Asn Asn Ser Glu Gly Thr Ile Ala Gly
 420 425 430
 Leu Leu Gly Ala Ser Pro Gly Ala Ser Ile Ala Pro Ser Ala Met Ile
 435 440 445
 Glu Leu Leu Glu Arg Cys Phe Gly Asp Arg Met Ile Glu Trp Gly Asp
 450 455 460
 Lys Leu Lys Asp Met Ile Pro Ser Tyr Gly Lys Lys Leu Ala Ser Glu
 465 470 475 480

Pro Ala Leu Phe Glu Gln Gln Trp Ala Arg Thr Gln Lys Thr Leu Lys
 485 490 495

Leu Glu Glu Ala
 500

- 5 <210> 25
 <211> 3314
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum
- 10 <220>
 <221> característica variada
 <222> (1)..(1000)
 <223> secuencia situada corriente arriba de la secuencia codificadora
- 15 <220>
 <221> CDS
 <222> (1001)..(2311)
 <223> gen gltA de tipo silvestre
- 20 <220>
 <221> característica variada
 <222> (1013)..(1015)
- 25 <220>
 <221> característica variada
 <222> (2312)..(3314)
 <223> secuencia situada corriente abajo de la región codificadora

<400> 25

atgagtcgcga	aggttgctgc	atcccagaat	gcggtcgcac	cacctaggga	aaggatgatc	60
tcgttagcctt	ctggaaggga	gaagaggtcg	gagagtccct	cgcggattga	acccacgacg	120
ttttttactg	ccggctgacg	gtgtgaggtta	ccgatgacgg	atgcggatcc	gtcgacaata	180
gcctgaatct	gttctggtcg	aaccttggaa	ggtccgcagc	cgaaacggcc	gtcgccaggg	240
atgaacttcag	agggcaggggt	ggggaaagtgc	gtcatgtctt	cggcaactt	tctgcgcttg	300
gaagtaaaag	ggccagggat	cgttaacgat	ctgacccaaac	aactataacc	ctgaagctgt	360
cagttccatag	caccctagat	tcttcacgca	gtctcccaa	cgatgaaaaa	cgccaaaaac	420
tggcgacacc	gaactattga	aaacgcgggg	attagttgac	cagccaccaa	tttggggta	480
gctcaaagtt	ttgcaaaagtt	ttcaatttct	aggttggtaa	tatcccctga	ggttgcgtta	540
tagggtggcg	aattgcacgg	ggaaagctac	tccgcaccca	tccttgcgc	gtgcacatcaca	600
aactttgcta	aactgtgcac	cagtccactt	attgtggat	tttaatgcc	ttaaaggcca	660
gcattttcac	cctctagcgg	ggttgaatgc	tggccttgag	ggtcagaac	taaatagcag	720
cacatcggca	caattgatct	gagttctatt	ggcgtgaccg	tggctactga	ttacggtggc	780
tgtgggtgg	cggaatgat	gtaaccaacg	tgattgtggg	ggaattggct	ctcacttcgg	840
atatggctaa	accgcattta	tcggtatagc	gtgttaaccg	gaccagattg	ggaaagaaat	900
gtgtcgagta	acaaaaactg	acatgcgcctt	ggcgcattcc	agttggtaag	aataaacggg	960
actacttccg	taatccggaa	gagttttttt	ccgaacaaat	atg ttt gaa agg gat		1015
				Met Phe Glu Arg Asp		

ES 2 382 363 T3

	1	5	
atc gtg gct act gat aac aac aag gct gtc ctg cac tac ccc ggt ggc Ile Val Ala Thr Asp Asn Asn Lys Ala Val Leu His Tyr Pro Gly Gly 10 15 20			1063
gag ttc gaa atg gac atc atc gag gct tct gag ggt aac aac ggt gtt Glu Phe Glu Met Asp Ile Ile Glu Ala Ser Glu Gly Asn Asn Gly Val 25 30 35			1111
gtc ctg ggc aag atg ctg tct gag act gga ctg atc act ttt gac cca Val Leu Gly Lys Met Leu Ser Glu Thr Gly Leu Ile Thr Phe Asp Pro 40 45 50			1159
ggt tat gtg agc act ggc tcc acc gag tcg aag atc acc tac atc gat Gly Tyr Val Ser Thr Gly Ser Thr Glu Ser Lys Ile Thr Tyr Ile Asp 55 60 65			1207
gac gat gcg gga atc ctg cgt tac cgc ggc tat gac atc gct gat ctg Gly Asp Ala Gly Ile Leu Arg Tyr Arg Gly Tyr Asp Ile Ala Asp Leu 70 75 80 85			1255
gct gag aat gcc acc ttc aac gag gtt tct tac cta ctt atc aac ggt Ala Glu Asn Ala Thr Phe Asn Glu Val Ser Tyr Leu Leu Ile Asn Gly 90 95 100			1303
gag cta cca acc cca gat gag ctt cac aag ttt aac gac gag att cgc Glu Leu Pro Thr Pro Asp Glu Leu His Lys Phe Asn Asp Glu Ile Arg 105 110 115			1351
cac cac acc ctt ctg gac gag gac ttc aag tcc cag ttc aac gtg ttc His His Thr Leu Leu Asp Glu Asp Phe Lys Ser Gln Phe Asn Val Phe 120 125 130			1399
cca cgc gac gct cac cca atg gca acc ttg gct tcc tcg gtt aac att Pro Arg Asp Ala His Pro Met Ala Thr Leu Ala Ser Ser Val Asn Ile 135 140 145			1447
ttg tct acc tac tac cag gac cag ctg aac cca ctc gat gag gca cag Leu Ser Thr Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Asn Pro Leu Asp Glu Ala Gln 150 155 160 165			1495
ctt gat aag gca acc gtt cgc ctc atg gca aag gtt cca atg ctg gct Leu Asp Lys Ala Thr Val Arg Leu Met Ala Lys Val Pro Met Leu Ala 170 175 180			1543
gcg tac gca cac cgc gca cgc aag ggt gct cct tac atg tac cca gac Ala Tyr Ala His Arg Ala Arg Lys Gly Ala Pro Tyr Met Tyr Pro Asp 185 190 195			1591
aac tcc ctc aat gcg cgt gag aac ttc ctg cgc atg atg ttc ggt tac Asn Ser Leu Asn Ala Arg Glu Asn Phe Leu Arg Met Met Phe Gly Tyr 200 205 210			1639
cca acc gag cca tac gag atc gac cca atc atg gtc aag gct ctg gac Pro Thr Glu Pro Tyr Glu Ile Asp Pro Ile Met Val Lys Ala Leu Asp 215 220 225			1687
aag ctg ctc atc ctg cac gct gac cac gag cag aac tgc tcc acc tcc Lys Leu Leu Ile Leu His Ala Asp His Glu Gln Asn Cys Ser Thr Ser 230 235 240 245			1735
acc gtt cgt atg atc ggt tcc gca cag gcc aac atg ttt gtc tcc atc Thr Val Arg Met Ile Gly Ser Ala Gln Ala Asn Met Phe Val Ser Ile 250 255 260			1783
gct ggt ggc atc aac gct ctg tcc ggc cca ctg cac ggt ggc gca aac Ala Gly Gly Ile Asn Ala Leu Ser Gly Pro Leu His Gly Gly Ala Asn 265 270 275			1831

ES 2 382 363 T3

cag gct gtt ctg gag atg ctc gaa gac atc aag agc aac cac ggt ggc Gln Ala Val Leu Glu Met Leu Glu Asp Ile Lys Ser Asn His Gly Gly 280 285 290	1879
gac gca acc gag ttc atg aac aag gtc aag aac aag gaa gac ggc gtc Asp Ala Thr Glu Phe Met Asn Lys Val Lys Asn Lys Glu Asp Gly Val 295 300 305	1927
cgc ctc atg ggc ttc gga cac cgc gtt tac aag aac tac gat cca cgt Arg Leu Met Gly Phe Gly His Arg Val Tyr Lys Asn Tyr Asp Pro Arg 310 315 320 325	1975
gca gca atc gtc aag gag acc gca cac gag atc ctc gag cac ctc ggt Ala Ala Ile Val Lys Glu Thr Ala His Glu Ile Leu Glu His Leu Gly 330 335 340	2023
ggc gac gat ctt ctg gat ctg gca atc aag ctg gaa gaa att gca ctg Gly Asp Asp Leu Leu Asp Leu Ala Ile Lys Leu Glu Glu Ile Ala Leu 345 350 355	2071
gct gat gat tac ttc atc tcc cgc aag ctc tac ccg aac gta gac ttc Ala Asp Asp Tyr Phe Ile Ser Arg Lys Leu Tyr Pro Asn Val Asp Phe 360 365 370	2119
tac acc ggc ctg atc tac cgc gca atg ggc ttc cca act gac ttc ttc Tyr Thr Gly Leu Ile Tyr Arg Ala Met Gly Phe Pro Thr Asp Phe Phe 375 380 385	2167
acc gta ttg ttc gca atc ggt cgt ctg cca gga tgg atc gct cac tac Thr Val Leu Phe Ala Ile Gly Arg Leu Pro Gly Trp Ile Ala His Tyr 390 395 400 405	2215
cgc gag cag ctc ggt gca gca ggc aac aag atc aac cgc cca cgc cag Arg Glu Gln Leu Gly Ala Ala Gly Asn Lys Ile Asn Arg Pro Arg Gln 410 415 420	2263
gtc tac acc ggc aac gaa tcc cgc aag ttg gtt cct cgc gag gag cgc Val Tyr Thr Gly Asn Glu Ser Arg Lys Leu Val Pro Arg Glu Glu Arg 425 430 435	2311
taaatttagc ggatgattct cgttcaactt cggccgaagc cacttcgtct gtcataatga cagggatgg ttcggccgtt tttcatgaa accaaaaat acgatttca aggagcatgt acagcacatg gaaaagccac agattgagct accggtcggt ccagcaccgg aagatctcg aatctctgac atcatcggtt gcgaaggagc agaagccgc ccaggtggag aagttgaggt ccactatgtg ggcgttgact ttgaaaccgg cgaggagttt gactttcctt gggatcggt acagaccagc cagttccac tcaacggcct cattgcaggt tggcaagagg gaattccagg catgaaggc ggcggacgtc gtcagctgac cattccgcca gaggctgtt acggccctga gggttccggc caccactgt ctggccgtac cttgtgtt atcatcgatt tgatcagcgc ataatttct ttactcgct aaacgctcaa atcgtgtgaa gcgactgtcg cgtccggccc tctccggatt gttatccaat tcggagaggg cttgtgtgat tttgtccgaga atttcttcaa caaagtgcgc gtttcggcgc acgatcccgt cgataagccc ttggctaaa agtgcgtgc cctgcacgccc ttgtcgctct atgatcccgtt cggcgtgggt ggtgtcgccg aagaggatgg ccgaggcgc cttctgtggc aatgcggaca gccacgcgtt ttcggccgcg tagaccagat cggcggcgcag catggccagc gcgcaccgc caacgcctg accaataatg accgaaacgg	2371 2431 2491 2551 2611 2671 2731 2791 2851 2911 2971 3031 3091 3151
tggggagggg agcgtcgata agcttggaca aggtgcgcgc aatcgagctt gcgtatgccga gctccctcagc cgcctgcgac aattcggcgc cggaggtgtc gatgtatggac acgatcgcc ggttagctc gcgcgcgcagc gaaatgccac gacgcgcacaa acg	3211 3271 3314

<210> 26
 <211> 437
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

5

<400> 26

Met	Phe	Glu	Arg	Asp	Ile	Val	Ala	Thr	Asp	Asn	Asn	Lys	Ala	Val	Leu
1					5				10				15		
His Tyr Pro Gly Gly Glu Phe Glu Met Asp Ile Ile Glu Ala Ser Glu															
	20					25				30					
Gly Asn Asn Gly val val Leu Gly Lys Met Leu Ser Glu Thr Gly Leu															
	35				40				45						
Ile Thr Phe Asp Pro Gly Tyr Val Ser Thr Gly Ser Thr Glu Ser Lys															
	50			55				60							
Ile Thr Tyr Ile Asp Gly Asp Ala Gly Ile Leu Arg Tyr Arg Gly Tyr															
	65		70			75			80						
Asp Ile Ala Asp Leu Ala Glu Asn Ala Thr Phe Asn Glu Val Ser Tyr															
	85			90			95								
Leu Leu Ile Asn Gly Glu Leu Pro Thr Pro Asp Glu Leu His Lys Phe															
	100			105			110								
Asn Asp Glu Ile Arg His His Thr Leu Leu Asp Glu Asp Phe Lys Ser															
	115			120			125								
Gln Phe Asn Val Phe Pro Arg Asp Ala His Pro Met Ala Thr Leu Ala															
	130			135			140								
Ser Ser Val Asn Ile Leu Ser Thr Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Asn Pro															
	145			150			155			160					
Leu Asp Glu Ala Gln Leu Asp Lys Ala Thr Val Arg Leu Met Ala Lys															
	165			170			175								
Val Pro Met Leu Ala Ala Tyr Ala His Arg Ala Arg Lys Gly Ala Pro															
	180			185			190								
Tyr Met Tyr Pro Asp Asn Ser Leu Asn Ala Arg Glu Asn Phe Leu Arg															
	195			200			205								
Met Met Phe Gly Tyr Pro Thr Glu Pro Tyr Glu Ile Asp Pro Ile Met															
	210			215			220								

ES 2 382 363 T3

val Lys Ala Leu Asp Lys Leu Leu Ile Leu His Ala Asp His Glu Gln
 225 230 235 240
 Asn Cys Ser Thr Ser Thr Val Arg Met Ile Gly Ser Ala Gln Ala Asn
 245 250 255
 Met Phe Val Ser Ile Ala Gly Gly Ile Asn Ala Leu Ser Gly Pro Leu
 260 265 270
 His Gly Gly Ala Asn Gln Ala Val Leu Glu Met Leu Glu Asp Ile Lys
 275 280 285
 Ser Asn His Gly Gly Asp Ala Thr Glu Phe Met Asn Lys Val Lys Asn
 290 295 300
 Lys Glu Asp Gly Val Arg Leu Met Gly Phe Gly His Arg Val Tyr Lys
 305 310 315 320
 Asn Tyr Asp Pro Arg Ala Ala Ile Val Lys Glu Thr Ala His Glu Ile
 325 330 335
 Leu Glu His Leu Gly Gly Asp Asp Leu Leu Asp Leu Ala Ile Lys Leu
 340 345 350
 Glu Glu Ile Ala Leu Ala Asp Asp Tyr Phe Ile Ser Arg Lys Leu Tyr
 355 360 365
 Pro Asn Val Asp Phe Tyr Thr Gly Leu Ile Tyr Arg Ala Met Gly Phe
 370 375 380
 Pro Thr Asp Phe Phe Thr Val Leu Phe Ala Ile Gly Arg Leu Pro Gly
 385 390 395 400
 Trp Ile Ala His Tyr Arg Glu Gln Leu Gly Ala Ala Gly Asn Lys Ile
 405 410 415
 Asn Arg Pro Arg Gln Val Tyr Thr Gly Asn Glu Ser Arg Lys Leu Val
 420 425 430
 Pro Arg Glu Glu Arg
 435

- <210> 27
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador gltA-XL-A1
 10 <400> 27
 tgagttctat tggcgtgacc 20

 <210> 28
 15 <211> 20

 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 20 <220>
 <223> cebador gltA-XL-E1

<400> 28
 ttgcacaacg atgatgtcag 20

5 <210> 29
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador gltA_1.p

<400> 29
 ccgtcgacaa tagcctgaa 19

15 <210> 30
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador gltA_2.p

<400> 30
 25 ccgaattctt cgagcatctc cagaac 26

<210> 31
 <211> 1695
 <212> ADN

30 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>
 <221> característica variada
 <222> (1)..(2)

35 <223> secuencia CC

<220>
 <221> característica variada
 <222> (3)..(8)

40 <223> sitio de corte por restricción para Sall

<220>
 <221> característica variada
 <222> (9)..(832)

45 <223> secuencia situada corriente arriba de la secuencia codificadora

<220>
 <221> CDS
 <222> (833)..(1687)

50 <223> parte N-terminal de la región codificadora

<220>
 <221> mutación

55 <222> (847)..(847)
 <223> transversion A > T

<220>
 <221> característica variada

60 <222> (1688)..(1693)
 <223> sitio de corte por restricción para EcoRI

<220>
 <221> característica variada

65 <222> (1694)..(1695)
 <223> secuencia GG

ES 2 382 363 T3

<400> 31

ccgtcgacaa tagcctgaat ctgttctggt cgaaccttgg aaggtccgca gccgaaacgg	60
ccgtcgccag gnatgaactc agagggcagg gtggggaaatg cggtcatgtc ttccggcaac	120
tttctgcgtc tggaaagtaaa agggccaggg atcgtaacg atctgaccca acaactataa	180
ccctgaagct gtcagttcct agcaccctag attcttcacg cagtctccca aacgatgaaa	240
aacgccccaaa actggcgaca ccgaactatt gaaaacgcgg ggatttagtt accagccacc	300
aattttggggg tagctcaaag ttttcaaaag ttttcaattt ctaggttggt aatatccct	360
gaggttgcgt tataagggtgg cgaattgcat gggaaagct actcggcacc catccttgc	420
gcgtgcataca caaaactttgc taaaactgtgc accagtccac ttattgtggg attttaatg	480
ccttaaaggc cagcatttc accctctagc ggggttgaat gctggccctg aggggtgcaga	540
actaaatagc agcacatcgg cacaattgat ctgagttcta ttggcgtgac cgtggctact	600
gattacggtg gctgtgggtg gtcggaaatg atgtaaacca cgtgattgtg gggaaattgg	660
ctctcacttc ggatatggct aaaccgcatt tatcggtata gcgtgttaac cggaccagat	720
tggaaaagaa atgtgtcgag taacaaaaac tgacatgcgc ttggcgcaccc ccagttggta	780
agaataaacg ggactacttc cgtaatccgg aagagttttt ttccgaacaa at atg ttt	838
Met Phe	
1	
gaa agg gtt atc gtg gct act gat aac aac aag gct gtc ctg cac tac	886
Glu Arg Val Ile Val Ala Thr Asp Asn Asn Lys Ala Val Leu His Tyr	
5 10 15	
ccc ggt ggc gag ttc gaa atg gac atc atc gag gct tct gag ggt aac	934
Pro Gly Gly Glu Phe Glu Met Asp Ile Ile Glu Ala Ser Glu Gly Asn	
20 25 30	
aac ggt gtt gtc ctg ggc aag atg ctg tct gag act gga ctg atc act	982
Asn Gly Val Val Leu Gly Lys Met Leu Ser Glu Thr Gly Leu Ile Thr	
35 40 45 50	
ttt gac cca ggt tat gtg agc act ggc tcc acc gag tcg aag atc acc	1030
Phe Asp Pro Gly Tyr Val Ser Thr Gly Ser Thr Glu Ser Lys Ile Thr	
55 60 65	
tac atc gat ggc gat gcg gga atc ctg cgt tac cgc ggc tat gac atc	1078
Tyr Ile Asp Gly Asp Ala Gly Ile Leu Arg Tyr Arg Gly Tyr Asp Ile	
70 75 80	
gct gat ctg gct gag aat gcc acc ttc aac gag gtt tct tac cta ctt	1126
Ala Asp Leu Ala Glu Asn Ala Thr Phe Asn Glu Val Ser Tyr Leu Leu	
85 90 95	
atc aac ggt gag cta cca acc cca gat gag ctt cac aag ttt aac gac	1174
Ile Asn Gly Glu Leu Pro Thr Pro Asp Glu Leu His Lys Phe Asn Asp	
100 105 110	
gag att cgc cac cac acc ctt ctg gac gag gac ttc aag tcc cag ttc	1222
Glu Ile Arg His His Thr Leu Leu Asp Glu Asp Phe Lys Ser Gln Phe	

ES 2 382 363 T3

115	120	125	130	
aac gtg ttc cca cgc gac gct cac cca atg gca acc ttg gct tcc tcg Asn Val Phe Pro Arg Asp Ala His Pro Met Ala Thr Leu Ala Ser Ser				1270
135	140	145		
gtt aac att ttg tct acc tac tac cag gac cag ctg aac cca ctc gat Val Asn Ile Leu Ser Thr Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Asn Pro Leu Asp				1318
150	155	160		
gag gca cag ctt gat aag gca acc gtt cgc ctc atg gca aag gtt cca Glu Ala Gln Leu Asp Lys Ala Thr Val Arg Leu Met Ala Lys Val Pro				1366
165	170	175		
atg ctg gct gcg tac gca cac cgc gca cgc aag ggt gct cct tac atg Met Leu Ala Ala Tyr Ala His Arg Ala Arg Lys Gly Ala Pro Tyr Met				1414
180	185	190		
tac cca gac aac tcc ctc aat gcg cgt gag aac ttc ctg cgc atg atg Tyr Pro Asp Asn Ser Leu Asn Ala Arg Glu Asn Phe Leu Arg Met Met				1462
195	200	205	210	
ttc ggt tac cca acc gag cca tac gag atc gac cca atc atg gtc aag Phe Gly Tyr Pro Thr Glu Pro Tyr Glu Ile Asp Pro Ile Met Val Lys				1510
215	220	225		
gct ctg gac aag ctg ctc atc ctg cac gct gac cac gag cag aac tgc Ala Leu Asp Lys Leu Leu Ile Leu His Ala Asp His Glu Gln Asn Cys				1558
230	235	240		
tcc acc tcc acc gtt cgt atg atc ggt tcc gca cag gcc aac atg ttt Ser Thr Ser Thr Val Arg Met Ile Gly Ser Ala Gln Ala Asn Met Phe				1606
245	250	255		
gtc tcc atc gct ggt ggc atc aac gct ctg tcc ggc cca ctg cac ggt Val Ser Ile Ala Gly Gly Ile Asn Ala Leu Ser Gly Pro Leu His Gly				1654
260	265	270		
ggc gca aac cag gct gtt ctg gag atg ctc gaa gaattcgg Gly Ala Asn Gln Ala Val Leu Glu Met Leu Glu				1695
275	280	285		

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polinucleótido aislado, que codifica un polipéptido, que abarca la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2, realizándose que el L-ácido aspártico en la posición 5 de la secuencia de aminoácidos es reemplazado por L-valina y realizándose que el polipéptido posee una actividad de citrato sintasa.
- 10 2. El polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** el polipéptido contiene desde uno hasta a lo sumo cinco intercambios conservativos de aminoácidos, permaneciendo la actividad de citrato sintasa del polipéptido inalterada en comparación con la actividad de citrato sintasa del polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO:6.
- 15 3. El polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 1-2, **caracterizado porque** el polinucleótido tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:5.
- 20 4. Polinucleótido aislado, que abarca una secuencia de nucleótidos, que desde la posición 1 hasta la 39 contiene la secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 1 hasta 39 de la SEQ ID NO:11, y desde la posición 40 hasta la 105 contiene una secuencia de nucleótidos, que codifica la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO:12, estando contenida L-valina en la posición 5, y el polinucleótido es utilizable para la introducción de la mutación en el gen gltA de acuerdo con la SEQ ID NO:1 en el cromosoma mediante un intercambio de alelos.
- 25 5. El polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado porque** él abarca la secuencia de nucleótidos desde la posición 263 hasta la 1.263 de la SEQ ID NO:7.
- 30 6. Vector, que contiene un polinucleótido de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 5.
7. Bacteria, que ha sido transformada con el vector de acuerdo con la reivindicación 6.
- 35 8. La bacteria de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizada porque** se trata de una bacteria del género *Corynebacterium* o *Escherichia*, de manera preferida de *Corynebacterium glutamicum* o *Escherichia coli*.
9. Bacteria del género *Corynebacterium*, de manera preferida *Corynebacterium glutamicum*, que contiene un polinucleótido de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 5.
- 40 10. Bacteria recombinante del género *Corynebacterium* que contiene un polinucleótido, que codifica un polipéptido con una actividad de citrato sintasa, que abarca la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2, estando contenida L-valina en la posición 5 de la secuencia de aminoácidos.
11. La bacteria recombinante del género *Corynebacterium* de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizada porque** el polipéptido contiene desde uno hasta a lo sumo cinco intercambios conservativos de aminoácidos, permaneciendo la actividad de citrato sintasa del polipéptido inalterada en comparación con la actividad de citrato sintasa del polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO:6.
- 45 12. La bacteria recombinante del género *Corynebacterium* de acuerdo con las reivindicaciones 10 hasta 11, **caracterizada porque** el polinucleótido posee la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:5.
13. La bacteria recombinante del género *Corynebacterium* de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 8 hasta 12, **caracterizada porque** ella contiene un polinucleótido, que codifica un polipéptido con una actividad de aspartato cinasa, que abarca la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:20, y que contiene uno o varios de los intercambios de aminoácidos escogidos entre el conjunto que se compone de
- 50 a) un intercambio de L-alanina en la posición 279 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO:20 por L-treonina (LysC A279T),
b) un intercambio de L-alanina en la posición 279 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO:20 por L-valina (LysC A279V),
c) un intercambio de L-leucina en la posición 297 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO:20 por L-glutamina (LysC L297Q),
d) un intercambio de L-serina en la posición 301 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO:20 por L-fenilalanina (LysC S301F),
e) un intercambio de L-serina en la posición 301 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO:20 por L-tirosina (LysC S301Y),
f) un intercambio de L-treonina en la posición 308 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO:20 por L-isoleucina (LysC T308I),
g) un intercambio de L-treonina en la posición 311 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO:20 por L-isoleucina (LysC T311I),
h) un intercambio de L-serina en la posición 317 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO:20 por L-alanina (LysC S317A),

- 5 i) un intercambio de L-arginina en la posición 320 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO:20 por glicina (LysC R320G),
j) un intercambio de glicina en la posición 345 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO:20 por L-ácido aspártico (LysC G345D),
k) un intercambio de L-treonina en la posición 380 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO:20 por L-isoleucina (LysC T380I), y
l) un intercambio de L-serina en la posición 381 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO:20 por L-fenilalanina (lysC S381F).
- 10 14. La bacteria recombinante del género *Corynebacterium* de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizada porque** se sobreexpresa el polinucleótido, que codifica un polipéptido con una actividad de aspartato cinasa.
- 15 15. La bacteria recombinante del género *Corynebacterium* de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 8 hasta 14, **caracterizada porque** ella contiene adicionalmente una o varias de las características, escogidas entre el conjunto que se compone de
- 20 a) un polinucleótido sobreexpresado, que codifica una dihidropicolinato sintasa (DapA),
b) un polinucleótido sobreexpresado, que codifica una aspartatosemialdehído deshidrogenasa (Asd),
c) un polinucleótido sobreexpresado, que codifica una diaminopimelato descarboxilasa (LysA),
d) un polinucleótido sobreexpresado, que codifica una asparato aminotransferasa (Aat),
e) un polinucleótido sobreexpresado, que codifica un polipéptido con una actividad de exportación de L-lisina (LysE),
f) una actividad desconectada o debilitada de la malato deshidrogenasa (Mdh),
g) una actividad desconectada o debilitada de la malato-quinona oxidoreductasa (Mqo),
25 h) un polinucleótido sobreexpresado, que codifica una piruvato carboxilasa (Pyc), e
i) una actividad desconectada o debilitada de la subunidad E1p del complejo de la piruvato deshidrogenasa (AceE)), de manera preferida
- 30 contiene todas las características a) hasta g).
- 35 16. La bacteria recombinante del género *Corynebacterium* de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 10 hasta 15, **caracterizada porque** se trata de *Corynebacterium glutamicum*.
- 40 17. Procedimiento para la producción de un L-aminoácido, de manera preferida L-lisina, L-valina o L-isoleucina, de manera especialmente preferida L-lisina, **caracterizado porque** se llevan a cabo las siguientes etapas:
- 45 a) fermentación de las bacterias del género *Corynebacterium* de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 8 hasta 16 en un medio nutritivo adecuado, y
b) acumulación del L-aminoácido en el medio nutritivo o en las células de las bacterias mencionadas.
- 50 18. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, **caracterizado porque** se recoge el L-aminoácido y/o porque se aísla y purifica el L-aminoácido.
- 55 19. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 17 o 18, **caracterizado porque** unos componentes del caldo de fermentación y/o de la biomasa permanecen en su totalidad o en porciones (> 0 a 100 %) en el producto final.
- 60 20. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 17 hasta 19, **caracterizado porque** se trata de un procedimiento por tandas, de un procedimiento de afluencia o de un procedimiento continuo.
- 65 21. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, **caracterizado porque** cuando en el caso del L-aminoácido se trate de L-lisina, se substraen agua desde un caldo de fermentación que contiene L-lisina, y se obtiene un producto con un contenido de agua de como máximo 5 % en peso, o porque se concentra primeramente un caldo de fermentación que contiene L-lisina, y a continuación se seca por atomización o se granula por atomización.
- 70 22. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, **caracterizado porque** cuando en el caso del L-aminoácido se trate de L-lisina, se llevan a cabo las siguientes etapas
- 75 a) se disminuye el valor del pH a 4,0 hasta 5,2 mediante la adición de ácido sulfúrico, y en el caldo se ajusta una relación molar de sulfato/L-lisina de 0,85 a 1,2, eventualmente mediante adición de otros compuestos adicionales que contienen sulfato, en particular de sulfato de amonio y/o hidrógeno-sulfato de amonio o ácido sulfúrico y amoníaco en las correspondientes relaciones y
b) la mezcla así obtenida se concentra mediante substracción de agua, y eventualmente se granula.

Figura 1:

Mapa del plásmido pK18mobsacB_gltAD5V

