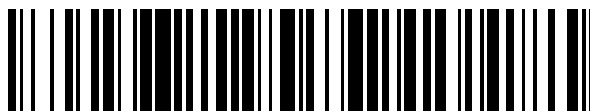


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



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

51 Int. Cl.:  
**C12N 9/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

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

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

30 Prioridad:  
**13.07.2006 DE 102006032634**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.06.2012**

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

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

74 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 mediante utilización de estas bacterias.

### 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 de los aminoácidos ramificados, y se investiga la repercusión sobre la producción de aminoácidos.

30 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 Biotechnology 104/1-3, (2003)) y en la obra de T. Scheper (coordinador administrativo) "Microbial Production of L-Amino Acids" (Producción microbiana de L-aminoácidos) (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 79, Editorial Springer, Berlín, Alemania, 2003) .

35 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 Biotechnology 104/1-3, (2003)).

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

45 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).

50 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.

### Misión del invento

55 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-soleucina, 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 (n° 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 mediante 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.

a) fermentación de las bacterias recombinantes conformes al invento del género *Corynebacterium glutamicum* en un medio nutritivo adecuado, y

b) 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. monohidrócloruro 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  
10 *Brevibacterium divaricatum* ATCC14020.

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),  
20 *Corynebacterium glutamicum* DSM17119 descrita en el documento (PCT/EP2006/060851),  
*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,  
*Brevibacterium flavum* FERM BP-2215 descrita en el documento US 5.705. 370, y  
40 *Brevibacterium flavum* FERM BP-2433 descrita en el documento US 5.705. 370.

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.

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 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)).

60 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 auxótrofos para L-ácido glutámico o respectivamente ácido cítrico o respectivamente sus revertantes 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 "Oligonukleotide 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 insignificadamente 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.

35 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 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*.

45 Asimismo, es posible purificar los polipéptidos y llevar a cabo los ensayos comparativos en los polipéptidos purificados.

50 La enzima citrato sintasa (n° 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 n° de EC 2.3.3.1.

55 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.

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.

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.

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.

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.

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*.

Ejemplos de tales vectores de plásmidos son los vectores pK\**mob* y pK\**mobsacB*, tales como, por ejemplo el pK18*mobsacB*, 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 sucraza) de, por ejemplo, *Bacillus*, o el gen *galK* (gen de la galactosa cinasa) de, por ejemplo, *Escherichia coli*. Por el concepto de "un gen, que actúa de un modo dominante negativo condicional" se entiende un gen, que en determinadas condiciones es desventajoso, por ejemplo tóxico, para el anfitrión, pero que en otras condiciones no tiene repercusiones negativas sobre el anfitrión que lleva el gen. Éstos hacen posible la selección en cuanto a unos sucesos de recombinación, en los que el vector es eliminado desde el cromosoma.

Además, por Nakamura y colaboradores (documento US 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.

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).

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.

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.

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*.

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.

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.

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.

20 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.

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.

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

30 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.

35 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.

40 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.

45 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,.

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.

50 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 (n° 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  
55 variantes de aspartato cinasas desensibilizadas son designadas también como alelos *lysC<sup>FBR</sup>*. En los bancos de datos públicos están disponibles informaciones sobre numerosos alelos *lysC<sup>FBR</sup>*. Algunos autores designan al gen *lysC* también como gen *ask*.

60 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.

65

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-isoleucina; 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-isoleucina; 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),
- 45
- 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 (995)) y el número de acceso L27125),
- 50
- 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 (995)) y el número de acceso L16848),
- 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-isoleucina, 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.

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.

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*.

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.

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 corineforme. Unos vectores de plásmidos adecuados son por ejemplo el pZ1 (Menkel y colaboradores, Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554) o los vectores pSELF descritos por Tauch y colaboradores (Journal of Biotechnology 99, 79-91 (2002)). Un artículo recopilativo sobre el tema de "plásmidos en Corynebacterium glutamicum" se encuentra en la cita de Tauch y colaboradores (Journal of Biotechnology 104, 27-40 (2003)).

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 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)).

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 corineforme.

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

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.

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.

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

a) un polinucleótido sobreexpresado (el gen dapA), que codifica una dihidrodipicolinato sintasa, (DapA, n° de EC 4.2.1.52)

b) un polinucleótido sobreexpresado (el gen asd), que codifica una aspartatosemialdehído deshidrogenasa (Asd, n° de EC 1.2.1.11),

c) un polinucleótido sobreexpresado (el gen lysA), que codifica una diaminopimelato descarboxilasa (LysA, n° de EC 4.1.1.20),

d) un polinucleótido sobreexpresado (el gen aat), que codifica una asparato aminotransferasa (Aat, n° de EC 2.6.1.1),

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* 184(1), 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*.

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.

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.

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

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

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*.

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.

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).

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.

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 una 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 proteínogeno, de manera preferida por L-fenilalanina o L-alanina, y

b) el intercambio de la L-alanina en la posición 201 por otro aminoácido proteínogeno, 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 bioprocesos 1. Introducción en la técnica de los bioprocesos] (editorial Gustav Fischer, Stuttgart, 1991)) o en el libro de texto de Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen [Biorreactores y disposiciones periféricas] (editorial Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)).

El medio de cultivo 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 palmítico, 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, amoníaco o respectivamente agua amoniacal, o compuestos de carácter ácido, tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. El pH se ajusta por lo general a un valor de 6,0 hasta 9,0, de manera preferida de 6,5 hasta 8. Para la represión del desarrollo de espuma se pueden emplear agentes antiespumantes, tales como por ejemplo ésteres poliglicólicos de ácidos grasos. Para la conservación de la estabilidad de los plásmidos, se pueden añadir al medio unas apropiadas sustancias que actúan de un modo selectivo, por ejemplo antibióticos. Con el fin de mantener unas condiciones aerobias, se 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, 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.

15 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.

20 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.

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

30 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 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 monohidrócloruro 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 %.

35 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.

40 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 monohidrócloruro de lisina (Lys-HCl) o el sulfato de lisina (Lys<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

45 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 desecha. Mediante una base, tal como, por ejemplo, hidróxido de sodio, potasio o amonio, se ajusta un valor del pH comprendido entre 9 y 11. Los componentes minerales (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.

50 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.

55 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

60

65

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.

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  $\leq 100$  %.

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 ( $\text{NaHSO}_3$ , 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.

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".

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.

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)).

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  $\mu\text{m}$ .

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  $\mu\text{m}$ .

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

El polvo 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.

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  $\mu\text{m}$ .



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.

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 menos las siguientes etapas:

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 y

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

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

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.

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.

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 amoniaco y ácido sulfúrico y el ácido sulfúrico propiamente dicho.

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  $\text{SO}_4^{2-}$ , 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 %.

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.

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(etilenglicoles) 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.

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

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 silícicos, silicatos, alginatos, estearatos, almidones, gomas y éteres de celulosa, tal como se han descrito en el documento de patente alemana 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 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.

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 mediante utilización de los microorganismos conformes al invento, en las siguientes etapas:

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,

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,

c) granulación del concentrado obtenido en la etapa b), de manera preferida a una temperatura de 50°C a 62°C, y

d) revestimiento del granulado obtenido en c) con uno o varios de los agentes de revestimiento (en inglés "coating agent(s)").

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

d1) la biomasa obtenida en la etapa a),

d2) un compuesto que contiene L-lisina, de manera preferida escogido entre el conjunto que se compone de hidrócloruro de L-lisina o sulfato de L-lisina,

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 silícicos, silicatos, materiales molidos, salvados y harinas, y

d4) una sustancia repelente del agua, que se escoge de manera preferida entre el conjunto que se compone de aceites, poli(etilenglicoles) y parafinas líquidas.

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.

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

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.

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

Secuenciación del gen gltA de la cepa DM678

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.

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:

*gltA\_XL-A1* (SEQ ID NO: 27):  
5' tgagttctattggcgtgacc 3'

*gltA\_XL-E1* (SEQ ID NO: 28):  
5' ttcgccaacgatgatgcag 3'

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).

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 µl, 10 µl del tampón 5 x Phusion HF suministrado conjuntamente, desoxinucleósido-trifosfatos en una concentración de en cada caso 200 µM, cebadores en una concentración de 0,5 µM, aproximadamente 50 ng de un ADN de molde y 2 unidades de la polimerasa Phusion. Mediante adición de H<sub>2</sub>O se ajustó el volumen a 50 µl.

La tanda de PCR se sometió en primer lugar a una desnaturalización introductoria a 98°C durante 30 segundos. Después de esto, repitiéndose 35x (veces), siguieron una etapa de desnaturalización a 98°C durante 20 segundos, una etapa para la fijación 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).

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

La secuencia 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

Construcción del vector de intercambio pk18mobsacB\_*gltAD5V*

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:

*gltA\_1.p* (SEQ ID NO: 29):  
5' CCGTCGACAATAGCCTGAA 3'

*gltA\_2.p* (SEQ ID NO: 30):  
5' CC-GAATTC-TTCGAGCATCTCCAGAAC 3'

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, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989), que había sido suplementado con 25 mg/l de kanamicina.

El ADN de plásmido fue aislado a partir de un transformante con ayuda del estuche QIAprep Spin Miniprep Kit de la entidad Qiagen (Hilden, Alemania) y fue comprobado mediante 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 sucraza de Bacillus subtilis. La expresión del gen sacB, que es inducible por sacarosa, conduce a la formación de la levano sucraza, que cataliza la síntesis del producto levano que es tóxico para C. glutamicum. Sobre un agar LB suplementado con sucrosa (= sacarosa) crecen por lo tanto sólo aquellos clones, en los que el pK18mobsacB\_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.

5 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 <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	25 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 g/l
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	1,0 g/l
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	10 mg/l
35 FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	10 mg/l
MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	5,0 mg/l
biotina (filtrada en condiciones estériles)	0,3 mg/l
tiamina * HCl (filtrada en condiciones estériles)	0,2 mg/l
40 CaCO <sub>3</sub>	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 autoclavaron. A continuación se añadieron las soluciones estériles de sustrato y de vitaminas así como el CaCO<sub>3</sub> 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-isooleucina 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.

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 sucraza de Bacillus subtilis. La expresión del gen sacB, que es inducible por sacarosa, conduce a la formación de la levano sucraza, que cataliza la síntesis del producto levano que es tóxico para C. glutamicum. Sobre un agar LB suplementado con 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..

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.

### Ejemplo 6

Producción de L-valina

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.

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).

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

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

Sales:

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	25 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 g/l
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	1,0 g/l
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	10 mg/l
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	10 mg/l
MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	5,0 mg/l
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 <sub>3</sub>	25 g/l

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 sustrato y de vitaminas así como el CaCO<sub>3</sub> 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.

- 25 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
- 30 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)
- 35 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
- <210> 1
- 15 <211> 1314
- <212> ADN
- <213> Corynebacterium glutamicum
- <220>
- 20 <221> CDS
- <222> (1)..(1311)
- <223> gen de tipo silvestre gltA
- <220>
- 25 <221> característica variada
- <222> (13)..(15)
- <400> 1
- 30

	<b>atg</b>	<b>ttt</b>	<b>gaa</b>	<b>agg</b>	<b>gat</b>	<b>atc</b>	<b>gtg</b>	<b>gct</b>	<b>act</b>	<b>gat</b>	<b>aac</b>	<b>aac</b>	<b>aag</b>	<b>gct</b>	<b>gtc</b>	<b>ctg</b>		
	Met	Phe	Glu	Arg	Asp	Ile	Val	Ala	Thr	Asp	Asn	Asn	Lys	Ala	Val	Leu		48
	1			5					10					15				
	<b>cac</b>	<b>tac</b>	<b>ccc</b>	<b>ggt</b>	<b>ggc</b>	<b>gag</b>	<b>ttc</b>	<b>gaa</b>	<b>atg</b>	<b>gac</b>	<b>atc</b>	<b>atc</b>	<b>gag</b>	<b>gct</b>	<b>tct</b>	<b>gag</b>		
	His	Tyr	Pro	Gly	Gly	Glu	Phe	Glu	Met	Asp	Ile	Ile	Glu	Ala	Ser	Glu		96
				20					25				30					
	<b>ggt</b>	<b>aac</b>	<b>aac</b>	<b>ggt</b>	<b>ggt</b>	<b>gtc</b>	<b>ctg</b>	<b>ggc</b>	<b>aag</b>	<b>atg</b>	<b>ctg</b>	<b>tct</b>	<b>gag</b>	<b>act</b>	<b>gga</b>	<b>ctg</b>		
	Gly	Asn	Asn	Gly	Val	Val	Leu	Gly	Lys	Met	Leu	Ser	Glu	Thr	Gly	Leu		144
			35				40					45						
	<b>atc</b>	<b>act</b>	<b>ttt</b>	<b>gac</b>	<b>cca</b>	<b>ggt</b>	<b>tat</b>	<b>gtg</b>	<b>agc</b>	<b>act</b>	<b>ggc</b>	<b>tcc</b>	<b>acc</b>	<b>gag</b>	<b>tcg</b>	<b>aag</b>		
	Ile	Thr	Phe	Asp	Pro	Gly	Tyr	Val	Ser	Thr	Gly	Ser	Thr	Glu	Ser	Lys		192
			50			55						60						
	<b>atc</b>	<b>acc</b>	<b>tac</b>	<b>atc</b>	<b>gat</b>	<b>ggc</b>	<b>gat</b>	<b>gcg</b>	<b>gga</b>	<b>atc</b>	<b>ctg</b>	<b>cgt</b>	<b>tac</b>	<b>cgc</b>	<b>ggc</b>	<b>tat</b>		
	Ile	Thr	Tyr	Ile	Asp	Gly	Asp	Ala	Gly	Ile	Leu	Arg	Tyr	Arg	Gly	Tyr		240
	65					70				75					80			
	<b>gac</b>	<b>atc</b>	<b>gct</b>	<b>gat</b>	<b>ctg</b>	<b>gct</b>	<b>gag</b>	<b>aat</b>	<b>gcc</b>	<b>acc</b>	<b>ttc</b>	<b>aac</b>	<b>gag</b>	<b>gtt</b>	<b>tct</b>	<b>tac</b>		
	Asp	Ile	Ala	Asp	Leu	Ala	Glu	Asn	Ala	Thr	Phe	Asn	Glu	Val	Ser	Tyr		288
				85					90					95				
	<b>cta</b>	<b>ctt</b>	<b>atc</b>	<b>aac</b>	<b>ggt</b>	<b>gag</b>	<b>cta</b>	<b>cca</b>	<b>acc</b>	<b>cca</b>	<b>gat</b>	<b>gag</b>	<b>ctt</b>	<b>cac</b>	<b>aag</b>	<b>ttt</b>		
	Leu	Leu	Ile	Asn	Gly	Glu	Leu	Pro	Thr	Pro	Asp	Glu	Leu	His	Lys	Phe		336
				100					105					110				
	<b>aac</b>	<b>gac</b>	<b>gag</b>	<b>att</b>	<b>cgc</b>	<b>cac</b>	<b>cac</b>	<b>acc</b>	<b>ctt</b>	<b>ctg</b>	<b>gac</b>	<b>gag</b>	<b>gac</b>	<b>ttc</b>	<b>aag</b>	<b>tcc</b>		
	Asn	Asp	Glu	Ile	Arg	His	His	Thr	Leu	Leu	Asp	Glu	Asp	Phe	Lys	Ser		384
			115					120					125					
	<b>cag</b>	<b>ttc</b>	<b>aac</b>	<b>gtg</b>	<b>ttc</b>	<b>cca</b>	<b>cgc</b>	<b>gac</b>	<b>gct</b>	<b>cac</b>	<b>cca</b>	<b>atg</b>	<b>gca</b>	<b>acc</b>	<b>ttg</b>	<b>gct</b>		
	Gln	Phe	Asn	Val	Phe	Pro	Arg	Asp	Ala	His	Pro	Met	Ala	Thr	Leu	Ala		432
			130				135					140						
	<b>tcc</b>	<b>tcg</b>	<b>gtt</b>	<b>aac</b>	<b>att</b>	<b>ttg</b>	<b>tct</b>	<b>acc</b>	<b>tac</b>	<b>tac</b>	<b>cag</b>	<b>gac</b>	<b>cag</b>	<b>ctg</b>	<b>aac</b>	<b>cca</b>		
	Ser	Ser	Val	Asn	Ile	Leu	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Gln	Asp	Gln	Leu	Asn	Pro		480
	145					150					155				160			
	<b>ctc</b>	<b>gat</b>	<b>gag</b>	<b>gca</b>	<b>cag</b>	<b>ctt</b>	<b>gat</b>	<b>aag</b>	<b>gca</b>	<b>acc</b>	<b>gtt</b>	<b>cgc</b>	<b>ctc</b>	<b>atg</b>	<b>gca</b>	<b>aag</b>		528



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

ES 2 382 363 T3

<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

<210> 3

<211> 2814

5 <212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> característica variada

10 <222> (1)..(750)

<223> secuencia situada corriente arriba de la región codificadora

<220>

<221> CDS

15 <222> (751)..(2061)

<223> gen gltA de tipo silvestre

<220>

<221> característica variada

20 <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 ggggaagtcg gtcattgtctt cgggcaactt tctgctgttg gaagtaaaag      60
ggccagggat cgtaacgat ctgaccaaac aactataacc ctgaagctgt cagttcctag      120
cacctagat tcttcacgca gtctcccaaa cgatgaaaaa cgccaaaac tggcgacacc      180
gaactattga aaacgcgggg attagttgac cagccacca tttgggggta gctcaaagtt      240
ttgcaaagtt ttcaatttct aggttgtaa tatcccctga ggttgcgta taggggtggcg      300
aattgcatgg ggaaagctac tcggcaccca tccttgcgc gtgcatcaca aactttgcta      360
aactgtgcac cagtccactt attgtgggat ttttaatgcc ttaaaggcca gcattttcac      420
cctctagcgg ggttgaatgc tggccttgag ggtgcagaac taaatagcag cacatcgcca      480
caattgatct gagttctatt ggcgtgaccg tggctactga ttacggtggc tgtgggtggt      540
cgggaatgat gtaaccaacg tgattgtggg ggaattggct ctcaattcgg atatggctaa      600
accgcattta tcggtatagc gtgtaaacg gaccagattg ggaaagaaat gtgtcgagta      660
acaaaaactg acatgcgctt ggcgcatccc agttgtaag aataaacggg actacttccg      720
taatccgga 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 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 tgc 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 Ala	cac His	cca Pro	atg Met 140	gca Ala	acc Thr	ttg Leu	gct Ala	tcc Ser 145	tcg Ser	gtt Val	aac Asn	att Ile 150	ttg Leu	tct Ser	acc Thr	1206
tac Tyr	tac Tyr	cag Gln 155	gac Asp	cag Gln	ctg Leu	aac Asn	cca Pro 160	ctc Leu	gat Asp	gag Glu	gca Ala	cag Gln 165	ctt Leu	gat Asp	aag Lys	1254
gca Ala 170	acc Thr	ggt Val	cgc Arg	ctc Leu	atg Met	gca Ala 175	aag Lys	ggt Val	cca Pro	atg Met	ctg Leu 180	gct Ala	gcg Ala	tac Tyr	gca Ala	1302
cac His 185	cgc Arg	gca Ala	cgc Arg	aag Lys	ggt Gly 190	gct Ala	cct Pro	tac Tyr	atg Met	tac Tyr 195	cca Pro	gac Asp	aac Asn	tcc Ser	ctc Leu 200	1350
aat Asn	gcg Ala	cgt Arg	gag Glu	aac Asn 205	ttc Phe	ctg Leu	cgc Arg	atg Met	atg Met 210	ttc Phe	ggt Gly	tac Tyr	cca Pro	acc Thr 215	gag Glu	1398
cca Pro	tac Tyr	gag Glu	atc Ile 220	gac Asp	cca Pro	atc Ile	atg Met	gtc Val 225	aag Lys	gct Ala	ctg Leu	gac Asp	aag Lys 230	ctg Leu	ctc Leu	1446
atc Ile	ctg Leu	cac His 235	gct Ala	gac Asp	cac His	gag Glu	cag Gln 240	aac Asn	tgc Cys	tcc Ser	acc Thr	tcc Ser 245	acc Thr	ggt Val	cgt Arg	1494
atg Met	atc Ile 250	ggt Gly	tcc Ser	gca Ala	cag Gln	gcc Ala 255	aac Asn	atg Met	ttt Phe	gtc Val	tcc Ser 260	atc Ile	gct Ala	ggt Gly	ggc Gly	1542
atc Ile 265	aac Asn	gct Ala	ctg Leu	tcc Ser	ggc Gly 270	cca Pro	ctg Leu	cac His	ggt Gly	ggc Gly 275	gca Ala	aac Asn	cag Gln	gct Ala 280	ggt Val	1590
ctg Leu	gag Glu	atg Met	ctc Leu	gaa Glu 285	gac Asp	atc Ile	aag Lys	agc Ser	aac Asn 290	cac His	ggt Gly	ggc Gly	gac Asp	gca Ala 295	acc Thr	1638
gag Glu	ttc Phe	atg Met	aac Asn 300	aag Lys	gtc Val	aag Lys	aac Asn 305	aag Lys	gaa Glu	gac Asp	ggc Gly	gtc Val	cgc Arg 310	ctc Leu	atg Met	1686
ggc Gly	ttc Phe	gga Gly 315	cac His	cgc Arg	ggt Val	tac Tyr	aag Lys 320	aac Asn	tac Tyr	gat Asp	cca Pro	cgt Arg 325	gca Ala	gca Ala	atc Ile	1734
gtc Val	aag Lys 330	gag Glu	acc Thr	gca Ala	cac His	gag Glu 335	atc Ile	ctc Leu	gag Glu	cac His	ctc Leu 340	ggt Gly	ggc Gly	gac Asp	gat Asp	1782
ctt Leu 345	ctg Leu	gat Asp	ctg Leu	gca Ala	atc Ile 350	aag Lys	ctg Leu	gaa Glu	gaa Glu	att Ile 355	gca Ala	ctg Leu	gct Ala	gat Asp	gat Asp 360	1830
tac Tyr	ttc Phe	atc Ile	tcc Ser	cgc Arg 365	aag Lys	ctc Leu	tac Tyr	ccg Pro	aac Asn 370	gta Val	gac Asp	ttc Phe	tac Tyr	acc Thr 375	ggc Gly	1878
ctg Leu	atc Ile	tac Tyr	cgc Arg 380	gca Ala	atg Met	ggc Gly	ttc Phe	cca Pro 385	act Thr	gac Asp	ttc Phe	ttc Phe	acc Thr 390	gta Val	ttg Leu	1926
ttc Phe	gca Ala	atc Ile 395	ggt Gly	cgt Arg	ctg Leu	cca Pro	gga Gly 400	tgg Trp	atc Ile	gct Ala	cac His	tac Tyr 405	cgc Arg	gag Glu	cag Gln	1974

ES 2 382 363 T3

```

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 taaatttagc 2071
Gly Asn Glu Ser Arg Lys Leu Val Pro Arg Glu Glu Arg
    425                430                435

ggatgattct cgttcaactt cggccgaagc cacttcgtct gtcataatga cagggatggt 2131
ttcggccggt tttgcatgaa accaaaaaat acgattttca aggagcatgt acagcacatg 2191
gaaaagccac agattgagct accggtcggt ccagcaccgg aagatctcgt aatctctgac 2251
atcatcgttg gcgaaggagc agaagcccg cccaggtggag aagttgaggt cactatgtg 2311
ggcgttgact ttgaaaccgg cgaggagttt gactcttctt gggatcgtgg acagaccagc 2371
cagttcccac tcaacggcct cattgcaggt tggcaagagg gaattccagg catgaaggtc 2431
ggcggacgtc gtcagctgac cattccgcca gaggctgctt acggccctga gggttccggc 2491
caccactgt ctggccgtac cctgggtgttc atcatcgatt tgatcagcgc ataattttct 2551
ttactgcgct aaacgctcaa atcgtgtgaa gcgactgtcg cgtcccgcc tctccggatt 2611
gttatccaat tcggagaggg cgttgctgat tgtgccgaga atttcttcaa caaagtgtc 2671
ggtttcggcg acgatcccg cgateagccc ttggcttaaa agtgctgctg cctgcacgcc 2731
ttgtcgtct atgatttccg cggcgtggtt ggtgtcgcgg aagaggatgg ccgaggcgcc 2791
ctctggtggc aatgcggaca gcc 2814

```

<210> 4

<211> 437

5 <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

```

10

ES 2 382 363 T3

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 Gly Glu Phe Glu Met Asp Ile Ile Glu Ala Ser Glu 20 25 30	96
ggt aac aac ggt gtt 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

25



ES 2 382 363 T3

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	ggt	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	ggt	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		
ggt	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	gcg	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	ttc	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	ggt	cgf	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	ggc	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	ggt	ggc	gca	aac	cag	gct	ggt	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	ggc	ttc	gga	cac	cgc	ggt	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	cgf	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	ggt	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	ttc	acc	gta	ttg	ttc	gca	atc	ggt	cgf	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	cgf	gag	cag	ctc	ggt	gca	gca	ggc	aac	aag	atc	1248

ES 2 382 363 T3

```

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  
 225 230 240

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

ES 2 382 363 T3

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (751)..(2061)  
 <223> alelo gltA

5

<220>  
 <221> característica variada  
 <222> (763)..(765)

10

<220>  
 <221> mutación  
 <222> (764)..(764)  
 <223> transversión A > T

15

<220>  
 <221> característica variada  
 <222> (2062)..(2814)  
 <223> secuencia situada corriente arriba de la región codificadora

20

<400> 7

```

    agggcagggg ggggaagtcg gtcattgtctt cgggcaactt tctgcgcttg gaagtaaaag      60
    ggccagggat cgttaacgat ctgacccaac aactataacc ctgaagctgt cagttcctag      120
    caccctagat tcttcacgca gtctcccaaa cgatgaaaaa cgcccaaaac tggcgacacc      180
    gaactattga aaacgcgggg attagttgac cagccaccaa tttgggggta gctcaaagtt      240
    ttgcaaagtt ttcaatttct aggttgtaa tatcccctga ggttgcgta taggggtggcg      300
    aattgcatgg ggaaagctac tcggcaccca tccttgctgc gtgcatcaca aactttgcta      360
    aactgtgcac cagtccactt attgtgggat ttttaatgcc ttaaaggcca gcattttcac      420
    cctctagcgg ggttgaatgc tggccttgag ggtgcagaac taaatagcag cacatcggca      480
    caattgatct gagttctatt ggcgtgaccg tggctactga ttacgggtggc tgtgggtggg      540
    cgggaatgat gtaaccaacg tgattgtggg ggaattggct ctcaactcgg atatggctaa      600
    accgcattta tcggtatagc gtgtaaccg gaccagattg ggaaagaaat gtgtcgagta      660
    acaaaaactg acatgcgctt ggcgcatccc agttggtaag aataaacggg actacttccg      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	ggt	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	ggt	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	ggt	cgc	ctc	atg	gca	aag	ggt	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	ggt	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	ggt		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	gga	cac	cgc	ggt	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	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      1878
Tyr Phe Ile Ser Arg Lys Leu Tyr Pro Asn Val Asp Phe Tyr Thr Gly
          365          370          375

ctg atc tac cgc gca atg ggc ttc cca act gac ttc ttc acc gta ttg      1926
Leu Ile Tyr Arg Ala Met Gly Phe Pro Thr Asp Phe Phe Thr Val Leu
          380          385          390

ttc gca atc ggt cgt ctg cca gga tgg atc gct cac tac cgc gag cag      1974
Phe Ala Ile Gly Arg Leu Pro Gly Trp Ile Ala His Tyr Arg Glu Gln
          395          400          405

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 taaatttagc      2071
Gly Asn Glu Ser Arg Lys Leu Val Pro Arg Glu Glu Arg
          425          430          435

ggatgattct cgttcaactt cggccgaagc cacttcgtct gtcataatga cagggatggg      2131
ttcggccggt tttgcatgaa accaaaaaat acgattttca aggagcatgt acagcacatg      2191
gaaaagccac agattgagct accggtcggg ccagcaccgg aagatctcgt aatctctgac      2251
atcatcgttg gcgaaggagc agaagcccgc ccaggtggag aagttgaggt ccaactatgt      2311
ggcgttgact ttgaaaccgg cgaggagttt gactcttcct gggatcgtgg acagaccagc      2371
cagttcccac tcaacggcct cattgcaggg tggcaagagg gaattccagg catgaaggtc      2431
ggcggacgtc gtcagctgac cattccgcca gaggctgctt acggccctga gggttccggc      2491
caccactgt ctggccgtac cctggtgttc atcatcgatt tgatcagcgc ataattttct      2551
ttactgcgct aaacgctcaa atcgtgtgaa gcgactgtcg cgtcccgcc tctccggatt      2611
gttatccaat tcggagaggg cgttgctgat tgtgccgaga atttcttcaa caaagtgctc      2671
ggtttcggcg acgatcccgt cgataagccc ttggcttaaa agtgcggtgcg cctgcacgcc      2731
ttgtcgctct atgatttccg cggcgtggtt ggtgtcgcgg aagaggatgg ccgaggcgcc      2791
ctctggtggc aatgcggaca gcc      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                                      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  
 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  
 Asn Cys Ser Thr Ser Thr Val Arg Met Ile Gly Ser Ala Gln Ala Asn  
                                     245                                      250  
 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 e s 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 ggggaagtcg gtcatgtctt cgggcaactt tctgcgcttg gaagtaaaag      60
ggccagggat cgtaacgat ctgacccaac aactataacc ctgaagctgt cagttcctag      120
caccctagat tcttcacgca gtctcccaaa cgatgaaaaa cgcccaaac tggcgacacc      180
gaactattga aaacgcgggg 'attagttgac cagccaccaa tttgggggta gtccaaagtt      240
ttgcaaagtt ttcaatttct aggttgtaa tatcccctga ggttgcgta taggggtggcg      300
aattgcatgg ggaaagctac tcggcaccca tccttgctgc gtgcatcaca aactttgcta      360
    
```

30



ES 2 382 363 T3

aactgtgcac cagtccactt attgtgggat ttttaatgcc ttaaaggcca gcattttcac	420
cctctagcgg ggttgaatgc tggccttgag ggtgcagaac taaatagcag cacatcggca	480
caattgatct gagttctatt ggcgtgaccg tggctactga ttacggtggc tgtgggtggt	540
cggaatgat gtaaccaacg tgattgtggg ggaattggct ctcacttcgg atatggctaa	600
accgcattta tcggtatagc gtgttaaccg gaccagattg ggaaagaaat 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	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 Glu Pro Leu His Gly Ala Asn Gln Ala Val	
265 270 275	
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 gga 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 Glu Ile Ala Leu Ala Asp Asp	
345 350 355 360	
tac ttc atc tcc cgc aag ctc tac ccg aac gta gac ttc tac acc ggc	1878
Tyr Phe Ile Ser Arg Lys Leu Tyr Pro Asn Val Asp Phe Tyr Thr Gly	
365 370 375	
ctg atc tac cgc gca atg ggc ttc cca act gac ttc ttc acc gta ttg	1926
Leu Ile Tyr Arg Ala Met Gly Phe Pro Thr Asp Phe Phe Thr Val Leu	
380 385 390	
ttc gca atc ggt cgt ctg cca gga tgg atc gct cac tac cgc gag cag	1974
Phe Ala Ile Gly Arg Leu Pro Gly Trp Ile Ala His Tyr Arg Glu Gln	
395 400 405	
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 taaatttagc	2071
Gly Asn Glu Ser Arg Lys Leu Val Pro Arg Glu Glu Arg	
425 430 435	
ggatgattct cgttcaactt cggccgaagc cacttcgtct gtcataatga cagggatggt	2131
ttcggccggt tttgcatgaa accaaaaaat acgattttca aggagcatgt acagcacatg	2191
gaaaagccac agattgagct accggtcggc ccagcaccgg aagatctcgt aatctctgac	2251
atcatcgttg gcgaaggagc agaagcccgcc ccagggtggag aagttgaggt cactatgtg	2311
ggcgttgact ttgaaaccgg cgaggagttt gactcttcct gggatcgtgg acagaccagc	2371
cagttcccac tcaacggcct cattgcaggt tggcaagagg gaattccagg catgaaggtc	2431
ggcggacgtc gtcagctgac cattccgcca gaggctgctt acggccctga gggttccggc	2491

ES 2 382 363 T3

```

caccactgt ctggccgtac cctggtgttc atcatcgatt tgatcagcgc ataattttct 2551
ttactgcgct aaacgctcaa atcgtgtgaa gcgactgtcg cgtcccgcc tctccggatt 2611
gttatccaat tcggagaggg cgttgctgat tgtgccgaga atttcttcaa caaagtgctc 2671
ggtttcggcg acgatcccgt cgataagccc ttggcttaaa agtgcggtcg 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
    
```

ES 2 382 363 T3

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

<212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

5

ES 2 382 363 T3

<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  
 ctactttccgt aatccggaag agtttttttc cgaacaaat atg ttt gaa agg nnn 54  
 Met Phe Glu Arg Xaa  
 1 5  
 atc gtg gct act gat aac aac aag gct gtc ctg cac tac ccc ggt ggc 102  
 Ile Val Ala Thr Asp Asn Asn Lys Ala Val Leu His Tyr Pro Gly Gly  
 10 15 20  
 gag 105  
 Glu

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

<220>  
 <221> característica variada  
 20 <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  
 1 5 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  
 35 <222> (102)..(104)  
 <223> n es a, c, g, ó t

<400> 13

40

**caaaaactga catgcgcttg gcgcatccca gttggtaaga ataaacggga ctacttcctg 60**

**aatccggaag agtttttttc 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)

<223> n e s a , c , g , ó t

30

<400> 15

ES 2 382 363 T3

```

gattgtgggg gaattggctc tcacttcgga tatggctaaa ccgcatttat cggtatagcg      60
tgtaaccgg accagattgg gaaagaaatg tgctcgagtaa caaaaactga catgcgcttg      120
gcgcatccca gttgtaaga ataaacggga ctacttccgt aatccggaag agtttttttc      180
cgaacaaat atg ttt gaa agg nnn atc gtg gct act gat aac aac aag gct      231
          1 Met Phe Glu Arg Xaa Ile Val Ala Thr Asp Asn Asn Lys Ala
          5
gtc ctg cac tac ccc ggt ggc gag ttc gaa atg gac atc atc gag gct      279
Val Leu His Tyr Pro Gly Gly Glu Phe Glu Met Asp Ile Ile Glu Ala
15          20          25          30

tct gag ggt aac aac ggt gtt gtc ctg ggc aag atg ctg tct gag act      327
Ser Glu Gly Asn Asn Gly Val Val Leu Gly Lys Met Leu Ser Glu Thr
          35          40          45

gga ctg atc act ttt gac cca ggt tat gtg agc act ggc tcc acc gag      375
Gly Leu Ile Thr Phe Asp Pro Gly Tyr Val Ser Thr Gly Ser Thr Glu
          50          55          60

tcg aag atc acc tac atc gat ggc gat gcg      405
Ser Lys Ile Thr Tyr Ile Asp Gly Asp Ala
          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
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 e s a, c, g, ó t

<400> 17

5

```

gttgtaata tcccctgagg ttgcgttata gggtagcgaa ttgcatgggg aaagctactc      60
ggcaccatc cttgtcgcgt gcatcacaaa ctttgctaaa ctgtgcacca gtccacttat      120
tgtgggattt ttaatgcctt aaaggccagc attttcacc tctagcgggg ttgaatgctg      180

gccttgaggg tgcagaacta aatagcagca catcggcaca attgatctga gttctattgg      240
cgtgaccgtg gctactgatt acggtggctg tgggtggctg ggaatgatgt aaccaacgtg      300
attgtggggg aattggctct cacttcggat atggctaaac cgcatttatc ggtatagcgt      360
gttaaccgga ccagattggg aaagaaatgt gtcgagtaac aaaaactgac atgcgcttgg      420
cgcaccccag ttgtaagaa taaacgggac tacttccgta atccggaaga gtttttttcc      480
gaacaaat atg ttt gaa agg nnn atc gtg gct act gat aac aac aag gct      530
          Met Phe Glu Arg Xaa Ile Val Ala Thr Asp Asn Asn Lys Ala
          1           5           10

gtc ctg cac tac ccc ggt ggc gag ttc gaa atg gac atc atc gag gct      578
Val Leu His Tyr Pro Gly Gly Glu Phe Glu Met Asp Ile Ile Glu Ala
15           20           25           30

tct gag ggt aac aac ggt gtt gtc ctg ggc aag atg ctg tct gag act      626
Ser Glu Gly Asn Asn Gly Val Val Leu Gly Lys Met Leu Ser Glu Thr
35           40           45

gga ctg atc act ttt gac cca ggt tat gtg agc act ggc tcc acc gag      674
Gly Leu Ile Thr Phe Asp Pro Gly Tyr Val Ser Thr Gly Ser Thr Glu
50           55           60

tcg aag atc acc tac atc gat ggc gat gcg gga atc ctg cgt tac cgc      722
Ser Lys Ile Thr Tyr Ile Asp Gly Asp Ala Gly Ile Leu Arg Tyr Arg
65           70           75

ggc tat gac atc gct gat ctg gct gag aat gcc acc ttc aac gag gtt      770
Gly Tyr Asp Ile Ala Asp Leu Ala Glu Asn Ala Thr Phe Asn Glu Val
80           85           90

tct tac cta ctt atc aac ggt gag cta cca acc cca gat gag ctt cac      818
Ser Tyr Leu Leu Ile Asn Gly Glu Leu Pro Thr Pro Asp Glu Leu His
95           100           105           110

aag ttt aac gac gag att cgc cac cac acc ctt ctg gac gag gac ttc      866
Lys Phe Asn Asp Glu Ile Arg His His Thr Leu Leu Asp Glu Asp Phe
115           120           125

aag tcc cag ttc aac gtg ttc cca cgc gac gct cac cca atg gca acc      914
Lys Ser Gln Phe Asn Val Phe Pro Arg Asp Ala His Pro Met Ala Thr
130           135           140

ttg gct tcc tcg gtt aac att ttg tct acc tac tac cag gac cag ctg      962
Leu Ala Ser Ser Val Asn Ile Leu Ser Thr Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu
145           150           155

aac cca ctc gat gag gca cag ctt gat aag gca acc gtt      1001
Asn Pro Leu Asp Glu Ala Gln Leu Asp Lys Ala Thr Val
160           165           170
    
```

<210> 18  
 <211> 171  
 <212> PRT  
 <213> Corynebacterium glutamicum

10

<220>  
 <221> característica variada  
 <222> (5)..(5)

15



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 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
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>

<221> CDS

15 <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 tgc tcc gca atg gga gac acc acg gat      144
Gly Asn Asp Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp
          35           40           45
    
```

20

ES 2 382 363 T3

gaa Glu	ctt Leu	cta Leu	gaa Glu	ctt Leu	gca Ala	gcg Ala	gca Ala	gtg Val	aat Asn	ccc Pro	gtt Val	ccg Pro	cca Pro	gct Ala	cgt Arg	192
	50					55					60					
gaa Glu	atg Met	gat Asp	atg Met	ctc Leu	ctg Leu	act Thr	gct Ala	ggt Gly	gag Glu	cgt Arg	att Ile	tct Ser	aac Asn	gct Ala	ctc Leu	240
65					70					75					80	
gtc Val	gcc Ala	atg Met	gct Ala	att Ile	gag Glu	tcc Ser	ctt Leu	ggc Gly	gca Ala	gaa Glu	gcc Ala	caa Gln	tct Ser	ttc Phe	acg Thr	288
				85					90					95		
ggc Gly	tct Ser	cag Gln	gct Ala	ggg Gly	gtg Val	ctc Leu	acc Thr	acc Thr	gag Glu	cgc Arg	cac His	gga Gly	aac Asn	gca Ala	cgc Arg	336
			100					105					110			
att Ile	ggt Val	gat Asp	gtc Val	act Thr	cca Pro	ggt Gly	cgt Arg	gtg Val	cgt Arg	gaa Glu	gca Ala	ctc Leu	gat Asp	gag Glu	ggc Gly	384
		115					120					125				
aag Lys	atc Ile	tgc Cys	att Ile	ggt Val	gct Ala	ggt Gly	ttc Phe	cag Gln	ggt Gly	ggt Val	aat Asn	aaa Lys	gaa Glu	acc Thr	cgc Arg	432
						135					140					
gat Asp	gtc Val	acc Thr	acg Thr	ttg Leu	ggt Gly	cgt Arg	ggt Gly	ggt Gly	tct Ser	gac Asp	acc Thr	act Thr	gca Ala	ggt Val	gcg Ala	480
145					150					155					160	
ttg Leu	gca Ala	gct Ala	gct Ala	ttg Leu	aac Asn	gct Ala	gat Asp	gtg Val	tgt Cys	gag Glu	att Ile	tac Tyr	tcg Ser	gac Asp	gtt Val	528
				165					170					175		
gac Asp	ggt Gly	gtg Val	tat Tyr	acc Thr	gct Ala	gac Asp	ccg Pro	cgc Arg	atc Ile	ggt Val	cct Pro	aat Asn	gca Ala	cag Gln	aag Lys	576
			180					185					190			
ctg Leu	gaa Glu	aag Lys	ctc Leu	agc Ser	ttc Phe	gaa Glu	gaa Glu	atg Met	ctg Leu	gaa Glu	ctt Leu	gct Ala	gct Ala	ggt Val	ggc Gly	624
		195					200					205				
tcc Ser	aag Lys	att Ile	ttg Leu	gtg Val	ctg Leu	cgc Arg	agt Ser	ggt Val	gaa Glu	tac Tyr	gct Ala	cgt Arg	gca Ala	ttc Phe	aat Asn	672
	210					215					220					
gtg Val	cca Pro	ctt Leu	cgc Arg	gta Val	cgc Arg	tcg Ser	tct Ser	tat Tyr	agt Ser	aat Asn	gat Asp	ccc Pro	ggc Gly	act Thr	ttg Leu	720
				230						235					240	
att Ile	gcc Ala	ggc Gly	tct Ser	atg Met	gag Glu	gat Asp	att Ile	cct Pro	gtg Val	gaa Glu	gaa Glu	gca Ala	gtc Val	ctt Leu	acc Thr	768
				245					250					255		
ggt Gly	gtc Val	gca Ala	acc Thr	gac Asp	aag Lys	tcc Ser	gaa Glu	gcc Ala	aaa Lys	gta Val	acc Thr	ggt Val	ctg Leu	ggg Gly	att Ile	816
			260					265					270			
tcc Ser	gat Asp	aag Lys	cca Pro	ggc Gly	gag Glu	gct Ala	gcg Ala	aag Lys	ggt Val	ttc Phe	cgt Arg	gcg Ala	ttg Leu	gct Ala	gat Asp	864
		275					280					285				
gca Ala	gaa Glu	atc Ile	aac Asn	att Ile	gac Asp	atg Met	ggt Val	ctg Leu	cag Gln	aac Asn	gtc Val	tct Ser	tct Ser	gta Val	gaa Glu	912
					295						300					
gac Asp	ggc Gly	acc Thr	acc Thr	gac Asp	atc Ile	acc Thr	ttc Phe	acc Thr	tgc Cys	cct Pro	cgt Arg	tcc Ser	gac Asp	ggc Gly	cgc Arg	960
	305				310					315					320	
cgc Gly	gcg Gly	atg Gly	gag Gly	atc Gly	ttg Gly	aag Gly	aag Gly	ctt Gly	cag Gly	ggt Gly	cag Gly	ggc Gly	aac Gly	tgg Gly	acc Gly	1008

ES 2 382 363 T3

Arg	Ala	Met	Glu	Ile	Leu	Lys	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	ggg	gct		1056
Asn	Val	Leu	Tyr	Asp	Asp	Gln	Val	Gly	Lys	Val	Ser	Leu	Val	Gly	Ala		
			340					345					350				
ggc	atg	aag	tct	cac	cca	ggt	gtt	acc	gca	gag	ttc	atg	gaa	gct	ctg		1104
Gly	Met	Lys	Ser	His	Pro	Gly	Val	Thr	Ala	Glu	Phe	Met	Glu	Ala	Leu		
		355				360					365						
cgc	gat	gtc	aac	gtg	aac	atc	gaa	ttg	att	tcc	acc	tct	gag	att	cgt		1152
Arg	Asp	Val	Asn	Val	Asn	Ile	Glu	Leu	Ile	Ser	Thr	Ser	Glu	Ile	Arg		
	370					375					380						
att	tcc	gtg	ctg	atc	cgt	gaa	gat	gat	ctg	gat	gct	gct	gca	cgt	gca		1200
Ile	Ser	Val	Leu	Ile	Arg	Glu	Asp	Asp	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Arg	Ala		
					390					395					400		
ttg	cat	gag	cag	ttc	cag	ctg	ggc	ggc	gaa	gac	gaa	gcc	gtc	gtt	tat		1248
Leu	His	Glu	Gln	Phe	Gln	Leu	Gly	Gly	Glu	Asp	Glu	Ala	Val	Val	Tyr		
				405					410					415			
gca	ggc	acc	gga	cgc													1263
Ala	Gly	Thr	Gly	Arg													
			420														

<210> 20

<211> 421

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	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						

10

ES 2 382 363 T3

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

ES 2 382 363 T3

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

```

cgacaggaca agcactgggt gcactaccaa gagggtgccg aaaccaagtg ctactgtttg      60
taagaaatat gccagcatcg cgtactcatg cctgcccacc acatcgggtg catcagagca      120
ttgagtaaag gtgagctcct tagggagcca tcttttgggg tgcggagcgc gatccgggtg      180
ctgaccacgg tgcccatg c gattgttaat gccgatgcta gggcgaaaag cacggcgagc      240
agattgcttt gcacttgatt cagggtagtt gactaaagag ttgctcgcga agtagcacct      300
gtcacttttg tctcaaatat taaatcgaat atcaatatat ggtctgttta ttggaacgcg      360
tcccagtggc tgagacgcat ccgctaaagc cccaggaacc ctgtgcagaa agaaaacact      420
cctctgggta ggtagacaca gtttataaag gtagagttga gcgggtaact gtcagcacgt      480
agatcgaag gtgcacaaag gtg gcc ctg gtc gta cag aaa tat ggc ggt tcc      533
                    Met Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser
                    1                    5                    10

tcg ctt gag agt gcg gaa cgc att aga aac gtc gct gaa cgg atc gtt      581
Ser Leu Glu Ser Ala Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val
                    15                    20                    25

gcc acc aag aag gct gga aat gat gtc gtg gtt gtc tgc tcc gca atg      629
Ala Thr Lys Lys Ala Gly Asn Asp Val Val Val Val Cys Ser Ala Met
                    30                    35                    40

gga gac acc acg gat gaa ctt cta gaa ctt gca gcg gca gtg aat ccc      677
Gly Asp Thr Thr Asp Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro
                    45                    50                    55

gtt ccg cca gct cgt gaa atg gat atg ctc ctg act gct ggt gag cgt      725
Val Pro Pro Ala Arg Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg
                    60                    65                    70                    75

att tct aac gct ctc gtc gcc atg gct att gag tcc ctt ggc gca gaa      773
Ile Ser Asn Ala Leu Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu
                    80                    85                    90

gcc caa tct ttc acg ggc tct cag gct ggt gtg ctc acc acc gag cgc      821
Ala Gln Ser Phe Thr Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg

```

ES 2 382 363 T3

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

ES 2 382 363 T3

```

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 taaagtttta aaggagtagt      1783
Glu Ala Val Val Tyr Ala Gly Thr Gly Arg
415                               420

tttacaatga ccaccatcgc agttgttggt gcaaccggcc aggtcggcca ggttatgcgc      1843
acccttttgg aagagcgcaa tttcccagct gacactgttc gtttctttgc tttcccacgt      1903
tccgcaggcc gtaagattga attccgtggc acggaaatcg aggtagaaga cttactcag      1963
gcaaccgagg agtccctcaa ggacatcgac gttgcgttgt tctccgctgg aggcaccgct      2023
tccaagcagt acgtccact gttcgtgct gcaggcgcga ctgttgtgga taactcttct      2083
gcttggcgca aggacgacga ggttccacta atcgtctctg aggtgaacct tttccgacaag      2143
gattccctgg tcaagggcat tattgcgaac cctaactgca ccaccatggc tgcgatgcca      2203
gtgctgaagc cacttcacga tgccgctggt cttgtaaagc ttcacgtttc ctcttaccag      2263
gct                                                                                   2266

```

- <210> 22
- <211> 421
- 5 <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

```

10

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 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



ES 2 382 363 T3

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 mco de tipo silvestre

<400> 23

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

15

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

ES 2 382 363 T3

```

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
                               485                               490                               495

ctt gag gaa gcc taa
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 Lys 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

ES 2 382 363 T3

Pro Ala Leu Phe Glu Gln Gln Trp Ala Arg Thr Gln Lys Thr Leu Lys  
 485 490 495  
 Leu Glu Glu Ala  
 500

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

```

<400> 25
    atgagtcgga aggttgctgc atcccagaat gcggtcgcac cacctagggg aaggatgatc    60
    tcgtagcctt ctggaagggg gaagaggtcg gagagtccct cgcggattga acccacgacg    120
    tttttactg cccgctgacg gtgtgaggta ccatgacggt atgctgatcc gtcgacaata    180
    gcctgaatct gttctggtcg aaccttgaa ggtccgcagc cgaaacggcc gtcgccaggg    240
    atgaactcag agggcagggg ggggaagtcg gtcatgtctt cgggcaactt tctgctgtg    300
    gaagtaaaag ggccagggat cgtaaacgat ctgacccaac aactataacc ctgaagctgt    360
    cagttcctag caccctagat tcttcacgca gtctcccaa c gatgaaaaa cgcccaaac    420
    tggcgacacc gaactattga aaacgcgggg attagttgac cagccaccaa tttgggggta    480
    gctcaaagtt ttgcaaagtt ttcaatttct aggttgtaa tatcccctga ggttgcgta    540
    taggggtggc aattgcatgg ggaaagctac tcggcaccca tccttgctgc gtgcatcaca    600
    aactttgcta aactgtgcac cagtccactt attgtgggat ttttaatgcc ttaaaggcca    660
    gcattttcac cctctagcgg ggttgaatgc tggccttgag ggtgcagaac taaatagcag    720
    cacatcgga caattgatct gagttctatt ggcgtgaccg tggctactga ttacggtggc    780
    tgtgggtggt cgggaatgat gtaaccaacg tgattgtggg ggaattggct ctcacttcgg    840
    atatggctaa accgcattta tcggtatagc gtgttaaccg gaccagattg ggaaagaaat    900
    gtgtcgagta acaaaaactg acatgcgctt ggcgcatccc 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	ctg	cac	tac	ccc	ggt	ggc	1063	Ile	Val	Ala	Thr	Asp 10	Asn	Asn	Lys	Ala	Val 15	Leu	His	Tyr	Pro	Gly 20	Gly	
gag	ttc	gaa	atg	gac	atc	atc	gag	gct	tct	gag	ggt	aac	aac	ggt	ggt	1111	Glu	Phe	Glu	Met 25	Asp	Ile	Ile	Glu	Ala	Ser	Glu	Gly	Asn	Asn	Gly 35	Val
gtc	ctg	ggc	aag	atg	ctg	tct	gag	act	gga	ctg	atc	act	ttt	gac	cca	1159	Val	Leu	Gly 40	Lys	Met	Leu	Ser	Glu	Thr	Gly	Leu	Ile	Thr 50	Phe	Asp	Pro
ggt	tat	gtg	agc	act	ggc	tcc	acc	gag	tcg	aag	atc	acc	tac	atc	gat	1207	Gly	Tyr 55	Val	Ser	Thr	Gly	Ser 60	Thr	Glu	Ser	Lys	Ile 65	Thr	Tyr	Ile	Asp
ggc	gat	gcg	gga	atc	ctg	cgt	tac	cgc	ggc	tat	gac	atc	gct	gat	ctg	1255	Gly	Arg	Ala	Gly	Ile 75	Leu	Arg	Tyr	Arg	Gly	Tyr 80	Asp	Ile	Ala	Asp	Leu 85
gct	gag	aat	gcc	acc	ttc	aac	gag	ggt	tct	tac	cta	ctt	atc	aac	ggt	1303	Ala	Glu	Asn	Ala 90	Thr	Phe	Asn	Glu	Val	Ser 95	Tyr	Leu	Leu	Ile	Asn	Gly 100
gag	cta	cca	acc	cca	gat	gag	ctt	cac	aag	ttt	aac	gac	gag	att	cgc	1351	Glu	Leu	Pro	Thr 105	Pro	Asp	Glu	Leu	His 110	Lys	Phe	Asn	Asp	Glu 115	Ile	Arg
cac	cac	acc	ctt	ctg	gac	gag	gac	ttc	aag	tcc	cag	ttc	aac	gtg	ttc	1399	His	His	Thr 120	Leu	Leu	Asp	Glu	Asp 125	Phe	Lys	Ser	Gln	Phe	Asn	Val	Phe
cca	cgc	gac	gct	cac	cca	atg	gca	acc	ttg	gct	tcc	tcg	ggt	aac	att	1447	Pro	Arg	Asp 135	Ala	His	Pro	Met 140	Ala	Thr	Leu	Ala 145	Ser	Val	Asn	Ile	
ttg	tct	acc	tac	tac	cag	gac	cag	ctg	aac	cca	ctc	gat	gag	gca	cag	1495	Leu	Ser	Thr	Tyr 150	Tyr	Gln 155	Asp	Gln	Leu	Asn	Pro 160	Leu	Asp	Glu	Ala	Gln 165
ctt	gat	aag	gca	acc	gtt	cgc	ctc	atg	gca	aag	ggt	cca	atg	ctg	gct	1543	Leu	Asp	Lys	Ala 170	Thr	Val	Arg	Leu	Met 175	Ala	Lys	Val	Pro	Met	Leu 180	Ala
gcg	tac	gca	cac	cgc	gca	cgc	aag	ggt	gct	cct	tac	atg	tac	cca	gac	1591	Ala	Tyr	Ala	His 185	Arg	Ala	Arg	Lys	Gly 190	Ala	Pro	Tyr	Met	Tyr 195	Pro	Asp
aac	tcc	ctc	aat	gcg	cgt	gag	aac	ttc	ctg	cgc	atg	atg	ttc	ggt	tac	1639	Asn	Ser	Leu 200	Asn	Ala	Arg	Glu	Asn 205	Phe	Leu	Arg	Met 210	Met	Phe	Gly	Tyr
cca	acc	gag	cca	tac	gag	atc	gac	cca	atc	atg	gtc	aag	gct	ctg	gac	1687	Pro	Thr 215	Glu	Pro	Tyr	Glu	Ile 220	Asp	Pro	Ile	Met 225	Val	Lys	Ala	Leu	Asp
aag	ctg	ctc	atc	ctg	cac	gct	gac	cac	gag	cag	aac	tgc	tcc	acc	tcc	1735	Lys	Leu	Leu	Ile 230	Leu	His 235	Ala	Asp	His	Glu	Gln 240	Asn	Cys	Ser	Thr	Ser 245
acc	ggt	cgt	atg	atc	ggt	tcc	gca	cag	gcc	aac	atg	ttt	gtc	tcc	atc	1783	Thr	Val	Arg	Met 250	Ile	Gly	Ser	Ala	Gln 255	Asn	Met	Phe	Val	Ser 260	Ile	
gct	ggt	ggc	atc	aac	gct	ctg	tcc	ggc	cca	ctg	cac	ggt	ggc	gca	aac	1831	Ala	Gly	Gly	Ile 265	Asn	Ala	Leu	Ser	Gly 270	Pro	Leu	His	Gly 275	Gly	Ala	Asn

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	1879
280 285 290	
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	1927
295 300 305	
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	1975
310 315 320 325	
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	2023
330 335 340	
ggc gac gat ctt ctg gat ctg gca atc aag ctg gaa gaa att gca ctg Gly Asp Asp Tyr Leu Asp Leu Ala Ile Lys Leu Glu Glu Ile Ala Leu	2071
345 350 355	
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	2119
360 365 370	
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	2167
375 380 385	
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	2215
390 395 400 405	
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	2263
410 415 420	
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	2311
425 430 435	
taaatttagc ggatgattct cgttcaactt cggccgaagc cacttcgtct gtcataatga	2371
cagggatggt ttcggccggt tttgcatgaa accaaaaaat acgattttca aggagcatgt	2431
acagcacatg gaaaagccac agattgagct accggtcggg ccagcaccgg aagatctcgt	2491
aatctctgac atcatcgttg gcgaaggagc agaagcccgc ccaggtggag aagttgaggt	2551
ccactatgtg ggcgttgact ttgaaaccgg cgaggagttt gactcttctt gggatcgtgg	2611
acagaccagc cagttcccac tcaacggcct cattgcaggt tggcaagagg gaattccagg	2671
catgaaggtc ggcggacgtc gtcagctgac cattccgcca gaggctgctt acggccctga	2731
gggttccggc caccactgt ctggccgtac cctggtgttc atcatcgatt tgatcagcgc	2791
ataattttct ttactgcgct aaacgctcaa atcgtgtgaa gcgactgtcg cgtcccggcc	2851
tctccggatt gttatccaat tcggagaggg cgttgctgat tgtgccgaga atttcttcaa	2911
caaagtgctc ggtttcggcg acgatcccgt cgataagccc ttggcttaaa agtgcggtgcg	2971
cctgcacgcc ttgtcgctct atgatttccg cggcgtggtt ggtgtcgcgg aagaggatgg	3031
ccgaggcgcc ctctggtggc aatgcggaaca gccacgcgct ttcggcccg tagaccagat	3091
cggcgggcag catggccagc gcgccaccgc caacgcctg accaataatg accgaaacgg	3151
tggggagggg agcgtcgata agcttgaca aggtgcgcgc aatcgagctt gcgatgccga	3211
gctcctcagc cgcctcgac aattcggcgc cggaggtgtc gatgatggac acgatcggca	3271
ggtttagctc gcgcgccagc gaaatgccac gacgcgcaaa acg	3314

ES 2 382 363 T3

<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

- 5 <210> 27
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial
  
- 10 <220>
- <223> cebador gItA-XL-A1
  
- <400> 27
- tgagtctat tggcgtgacc 20
  
- 15 <210> 28
- <211> 20
  
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial
  
- 20 <220>
- <223> cebador gItA-XL-E1

<400> 28  
 ttcgccaacg atgatgcag 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

ccgctcgacaa tagcctgaat ctgttctggt cgaaccttgg aaggtccgca gccgaaacgg	60
ccgctcgccag ggatgaactc agagggcagg gtggggaagt cggtcatgtc ttcgggcaac	120
tttctgcgct tggaagtaaa agggccaggg atcgtaacg atctgacca acaactataa	180
ccctgaagct gtcagttcct agcaccctag attcttcacg cagtctccca aacgatgaaa	240
aacgccc aaa actggcgaca ccgaactatt gaaaacgcgg ggattagtgtg accagccacc	300
aatttggggg tagctcaaag ttttgcaaag ttttcaattt ctaggttggt aatatcccct	360
gaggttgctgct tataggggtg cgaattgcat ggggaaagct actcggcacc catccttgtc	420
gcgtgcatca caaactttgc taaactgtgc accagtcac ttattgtggg atttttaatg	480
ccttaaaggc cagcattttc accctctagc ggggttgaat gctggccttg aggggtgcaga	540
actaaatagc agcacatcgg cacaattgat ctgagttcta ttggcgtgac cgtggctact	600
gattacgggtg gctgtgggtg gtcgggaatg atgtaaccaa cgtgattgtg ggggaattgg	660
ctctcacttc ggatatggct aaaccgatt tatcgggtata gcgtgttaac cggaccagat	720
tgggaaagaa atgtgtcgag taacaaaac tgacatgcgc ttggcgcac ccagttggtg	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 tct 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	135	140	145	1270
ggt 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	150	155	160	1318
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	165	170	175	1366
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	180	185	190	1414
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	195	200	205	1462
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	215	220	225	1510
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	230	235	240	1558
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	245	250	255	1606
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	260	265	270	1654
ggc gca aac cag gct gtt ctg gag atg ctc gaa gaattcgg Gly Ala Asn Gln Ala Val Leu Glu Met Leu Glu	275	280	285	1695

**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 posición1 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.
- 35 7. Bacteria, que ha sido transformada con el vector de acuerdo con la reivindicación 6.
- 40 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.
- 45 9. Bacteria del género Corynebacterium, de manera preferida Corynebacterium glutamicum, que contiene un polinucleótido de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 5.
- 50 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.
- 55 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.
- 60 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.
- 65 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
- 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),

- 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),  
 5 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 dihidrodipicolinato 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),  
 25 g) una actividad desconectada o debilitada de la malato-quinona oxidorreductasa (Mqo),  
 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).
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*.
- 35 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:
- 40 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.
- 45 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.
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.
- 50 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.
- 55 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.
- 60 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
- 65 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

