

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 918**

51 Int. Cl.:

C12N 9/04 (2006.01)

C07K 14/34 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2006 E 06725146 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **05.12.2007 EP 1861493**

54 Título: **Alelos mutados del gen zwf (G6PDH) de bacterias corineformes para aumentar la producción de lisina**

30 Prioridad:

24.03.2005 DE 102005013676

07.03.2006 WO PCT/EP2006/060519

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

06.02.2013

73 Titular/es:

EVONIK DEGUSSA GMBH (100.0%)

Rellinghauser Strasse 1-11

45128 Essen, DE

72 Inventor/es:

BATHE, BRIGITTE;

SCHISCHKA, NATALIE y

THIERBACH, GEORG

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 394 918 T3

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

DESCRIPCIÓN

Alelos mutados del gen zwf (G6PDH) de bacterias corineformes para aumentar la producción de lisina

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

10 Estado de la técnica

Los aminoácidos encuentran uso en la medicina humana y en la industria farmacéutica, en la industria alimentaria y muy especialmente en la nutrición de animales.

15 Es conocido que ciertos aminoácidos se producen mediante 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. Ciertos mejoramientos de los procedimientos pueden concernir a 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 al tratamiento para dar la forma del producto, mediante p.ej. una cromatografía con intercambio de iones, o a las propiedades intrínsecas de rendimiento del microorganismo propiamente dicho.

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

25 Desde hace algunos años se emplean asimismo unos métodos de la técnica del ADN recombinante para el mejoramiento de las cepas de *Corynebacterium* productoras de L-aminoácidos, mediante el recurso de que se amplifican unos genes individuales para la biosíntesis de aminoácidos, y se investiga la repercusión sobre la producción de aminoácidos. Una exposición recopilativa sobre diversos aspectos de la genética, del metabolismo y la biotecnología de *Corynebacterium glutamicum* se pueden encontrar en la cita de Pühler (coordinador jefe de edición) en el *Journal of Biotechnology* 104 (1-3), 1-338, 2003.

30 La secuencia de nucleótidos del gen que codifica la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Corynebacterium glutamicum* está a disposición de un modo general, entre otros lugares, en el banco de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) de la National Library of Medicine (Bethesda, MD, EE.UU.). Ella se puede deducir además del documento de solicitud de patente internacional WO 01/00844 como la secuencia n° 243 (= AX065117).

35 En el documento WO 01/70995 se describe un mejoramiento de la producción por fermentación de L-aminoácidos por bacterias corineformes mediante el reforzamiento del gen zwf.

40 En los documentos WO 01/98472 y WO 03/042389 y en el documento de solicitud de patente de los EE.UU. US 2003/0175911 A1 se informa sobre nuevas mutaciones en el gen zwf.

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

50 La biosíntesis microbiana de L-aminoácidos en bacterias corineformes es un sistema complejo y está entrelazada en múltiples aspectos con otras diversas rutas de metabolismo en la célula. Por lo tanto, no se puede realizar ninguna predicción sobre cual es la mutación que modifica la actividad catalítica de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de tal manera que se mejore la producción de L-aminoácidos. Por lo tanto, es deseable tener a disposición otras variantes de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

55 Para obtener el mejor carácter sinóptico, la secuencia de nucleótidos del gen zwf (gen de tipo silvestre) que codifica la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa o respectivamente la subunidad Zwf de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Corynebacterium glutamicum*, se representa de acuerdo con los datos del banco de datos del NCBI en la SEQ ID NO: 1, y la secuencia de aminoácidos de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa codificada, que se establece a partir de ésta, se representa en las SEQ ID NO: 2 y 4. En la SEQ ID NO: 3 se indican adicionalmente unas secuencias de nucleótidos, que están situadas corriente arriba (en inglés "upstream") y corriente abajo (en inglés "downstream").

Misión del invento

Los autores del invento se han planteado la misión de poner a disposición unas nuevas medidas técnicas para realizar una mejorada producción de aminoácidos, en particular de L-lisina y L-triptófano.

Descripción del invento

Son objeto del invento unos mutantes de bacterias corineformes, producidos o respectivamente aislados, que segregan de manera preferente ciertos aminoácidos, y que contienen un gen o respectivamente un alelo, que codifica un polipéptido con actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, caracterizado porque el polipéptido abarca una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO:2, en la que en la posición 321 está contenida la L-serina.

El polipéptido, que está contenido en los mutantes conformes al invento, puede ser designado asimismo como polipéptido Zwf o como subunidad Zwf de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

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

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 a partir del estado de la técnica también bajo otras denominaciones de especies. A éstas pertenecen, por ejemplo:

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

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

Corynebacterium glutamicum DM58-1/pDM6 (= DSM4697) descrita en el documento de patente europea EP 0 358 940,

Corynebacterium glutamicum MH20-22B (= DSM16835) descrita en la cita de Menkel y colaboradores (Applied and Environmental Microbiology 55(3), 684-688 (1989)),

Corynebacterium glutamicum AHP-3 (= FERM BP-7382) descrita en el documento EP 1 108 790,

Corynebacterium glutamicum NRRL B-11474 descrita en el documento de patente de los EE.UU. US 4.275.157,

Corynebacterium thermoaminogenes AJ12521 (= FERM BP-3304) descrita en el documento US 5.250.423, o las cepas que producen L-triptófano

Corynebacterium glutamicum K76 (= FERM BP-1847) descrita en el documento US 5.563.052,

Corynebacterium glutamicum BPS13 (= FERM BP-1777) descrita en el documento US 5.605.818, y

Corynebacterium glutamicum FERM BP-3055, descrita en el documento US 5.235.940.

Se encuentran datos acerca de la clasificación taxonómica de ciertas 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-A-5.250.434.

Las cepas con la denominación "ATCC" se pueden adquirir de la American Type Culture Collection (Colección americana de cultivos tipos) (Manassas, VA, EE.UU.). Las cepas con la denominación "DSM" se pueden adquirir de la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares) (DSMZ, Braunschweig, Alemania). Las cepas con la denominación "NRRL" se pueden adquirir de la Agricultural Research Service Patent Culture Collection (Colección de cultivos de patentes del Servicio para la Investigación Agrícola) (ARS, Peoria, Illinois, EE.UU.). Las cepas con la denominación "FERM" se pueden adquirir del National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Instituto nacional de ciencia y tecnología

industrial avanzada (AIST Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba Ibaraki, Japón). Las cepas mencionadas de *Corynebacterium thermoaminogenes* (FERM BP-1539, FERM BP-1540, FERM BP-1541 y FERM BP-1542) se describen en el documento US-A 5.250.434.

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. A los L-aminoácidos pertenece asimismo la L-homoserina.

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

Son objeto del invento además unos mutantes de bacterias corineformes, que contienen un alelo de *zwf*, que codifica un polipéptido con la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que abarca la SEQ ID NO: 2, estando contenida la L-serina en la posición 321. Eventualmente, la secuencia de aminoácidos del polipéptido contiene además de esto en la posición 8 un intercambio de aminoácidos de L-serina por otro aminoácido proteinógeno, de manera preferida L-treonina. La descripción divulga además unos mutantes de bacterias corineformes, que contienen un alelo de *zwf*, que codifica un polipéptido con la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que en la posición correspondiente a la posición 321 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 contiene cualquier aminoácido proteinógeno, exceptuando la glicina, que de manera preferida contiene L-serina, abarcando el gen un secuencia de nucleótidos, que es idéntica a la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido, que es obtenible mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR acrónimo de Polymerase Chain Reaktion) mediando utilización de un par de cebadores, cuyas secuencias de nucleótidos abarcan en cada caso por lo menos 15 nucleótidos consecutivos, que se escogen entre las posiciones 1 y 307 de la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO:11, y entre la secuencia de nucleótidos complementaria situada entre las posiciones 2.100 y 1.850 de la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO:11. Ejemplos de tales pares de cebadores adecuados se representan en las SEQ ID NO:17 y SEQ ID NO: 18 y en las SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO:20. Como material de partida (ADN de molde, en inglés "template-DNA") se prefiere un ADN cromosomal de bacterias corineformes, que ha sido tratado en particular con un agente mutágeno. Se prefiere especialmente el ADN cromosomal del género *Corynebacterium* y se prefiere muy especialmente el de la especie *Corynebacterium glutamicum*.

La descripción divulga además unos mutantes de bacterias corineformes, que contienen un alelo de *zwf*, que codifica un polipéptido con la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que abarca una secuencia de aminoácidos con una longitud correspondiente a 514 L-aminoácidos, estando contenido en la posición 321 cualquier aminoácido proteinógeno exceptuando la glicina, de manera preferida L-serina. Eventualmente, la secuencia de aminoácidos del polipéptido contiene además de esto un intercambio de aminoácidos de L-serina por otro aminoácido proteinógeno, de manera preferida L-treonina, en la posición 8.

La descripción divulga además mutantes de bacterias corineformes, que contienen un alelo de *zwf*, que codifica un polipéptido con la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que en las posiciones 312 hasta 330 de la secuencia de aminoácidos contiene la secuencia de aminoácidos que corresponde a las posiciones 312 hasta 330 de la SEQ ID NO:6 u 8. De manera preferida, la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado contiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 307 hasta 335 de la SEQ ID NO:6 u 8 o a las posiciones 292 hasta 350 de la SEQ ID NO:6 u 8, a las posiciones 277 hasta 365 de la SEQ ID NO:6 u 8 o a las posiciones 262 hasta 380 de la SEQ ID NO:6 u 8 o a las posiciones 247 hasta 395 de la SEQ ID NO:6 u 8 o a las posiciones 232 hasta 410 de la SEQ ID NO:6 u 8 o a las posiciones 202 hasta 440 de la SEQ ID NO:6 u 8 o a las posiciones 172 hasta 470 de la SEQ ID NO:6 u 8 o a las posiciones 82 hasta 500 de la SEQ ID NO:6 u 8 o a las posiciones 2 hasta 512 de la SEQ ID NO:6 u 8 o a las posiciones 2 hasta 513 de la SEQ ID NO:6 u 8 o a las posiciones 2 hasta 514 de la SEQ ID NO:6 u 8. De manera muy especialmente preferida, la longitud del polipéptido codificado abarca 514 aminoácidos.

La descripción divulga además unos mutantes de bacterias corineformes, que contienen un alelo de *zwf*, que codifica un polipéptido con la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que en la posición 321 o respectivamente en la correspondiente posición de la secuencia de aminoácidos contiene cualquier aminoácido exceptuando la glicina, dándose la preferencia al intercambio por L-serina, y cuya secuencia de aminoácidos es idéntica además por lo menos en un 90 %, de manera preferida por lo menos en un 92 % o por lo menos en un 94 % o por lo menos en un 96 %, y de manera muy especialmente preferida por lo menos en un 97 % o por lo menos en un 98 % o por lo menos en un 99 % a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6. Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos, que posee una identidad de por lo menos un 99 % con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:6, se muestra en las SEQ ID NO: 8 y 10. El polipéptido de esta glucosa-6-fosfato deshidrogenasa posee, de manera adicional al intercambio de aminoácidos en la posición 321, el intercambio de aminoácidos de L-serina por L-treonina en la posición 8.

La descripción divulga además unos mutantes de bacterias corineformes, que contienen un alelo de zwf, que codifica un polipéptido con la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que en la posición 321 o respectivamente en la correspondiente posición de la secuencia de aminoácidos contiene cualquier aminoácido exceptuando la glicina, dándose la preferencia al intercambio por L-serina, y cuya secuencia de nucleótidos es idéntica además por lo menos en un 90 %, de manera preferida por lo menos en un 92 % o por lo menos en un 94 % o por lo menos en un 96 %, y de manera muy especialmente preferida por lo menos en un 97 % o por lo menos en un 98 % o por lo menos en un 99 % a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:5. Un ejemplo de una secuencia de nucleótidos de un alelo de zwf, que posee una identidad de por lo menos un 99 % con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:5, se muestra en la SEQ ID NO:7. La secuencia de nucleótidos de este alelo de zwf posee, de manera adicional al intercambio de nucleótidos de guanina por adenina en la posición 961 (véase la SEQ ID NO:5), el intercambio de nucleótidos de timina por adenina en la posición 22 (véase la SEQ ID NO:7). Otro ejemplo adicional de una secuencia de nucleótidos de un alelo de zwf, que posee una identidad de por lo menos un 99 % con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:5, se muestra en la SEQ ID NO:9. La secuencia de nucleótidos de este alelo de zwf posee, de manera adicional al intercambio de nucleótidos de guanina por adenina en la posición 961 (véase la SEQ ID NO:5) y al intercambio de nucleótidos de timina por adenina en la posición 22 (véase la SEQ ID NO:7), los intercambios de nucleótidos de citosina por timina en la posición 138, de citosina por timina en la posición 279, de timina por citosina en la posición 738, de citosina por timina en la posición 777 y de guanina por adenina en la posición 906 (véase la SEQ ID NO:9).

Es conocido que los intercambios conservativos de aminoácidos modifican sólo insignificamente la actividad enzimática. De una manera correspondiente, el alelo de zwf contenido en mutantes, que codifica un polipéptido con la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, puede contener adicionalmente a la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:8 o respectivamente en la SEQ ID NO:10, uno (1) o varios intercambio(s) conservativo(s) de aminoácidos. De manera preferida, el polipéptido contiene a lo sumo dos (2), o a lo sumo tres (3), a lo sumo cuatro (4) o a lo sumo cinco (5) intercambios conservativos de aminoácidos.

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

Un ejemplo de un intercambio conservativo de aminoácidos es el intercambio de serina por treonina en la posición 8 de la SEQ ID NO:6, que conduce a la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO:8 o respectivamente la SEQ ID NO:10.

Durante el trabajo realizado en el presente invento, mediante una comparación de la secuencia de aminoácidos con el programa Clustal (Thompson y colaboradores, Nucleic Acids Research 22, 4637-4680 (1994)), se comprobó que las secuencias de aminoácidos de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de diferentes bacterias tales como, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces avermitilis*, *Corynebacterium efficiens* y *Corynebacterium glutamicum* está contenido un motivo de secuencia que se compone de la secuencia Val-Ile-Phe-Gly-Ala-Afa-Gly-Asp-Leu, un motivo de secuencia que se compone de la secuencia Arg-Ile-Asp-His-Tyr-Leu-Gly-Lys y también un motivo de secuencia que se compone de la secuencia Arg-Trp-Ala-Gly-Val-Pro-Phe-Tyr-Bra-Arg-Thr-Gly-Lys-Arg. La designación "Ala" representa a los aminoácidos Ala o Val, la designación "Afa" representa a los aminoácidos Lys o Thr y la designación "Bra" representa a los aminoácidos Ile o Leu.

De una manera correspondiente, se prefieren aquellos mutantes de bacterias corineformes, que contienen un alelo de zwf, que codifica un polipéptido con la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que abarca por lo menos una secuencia de aminoácidos que se escoge entre el conjunto que se compone de Val-Ile-Phe-Gly-Ala-Afa-Gly-Asp-Leu, Arg-Ile-Asp-His-Tyr-Leu-Gly-Lys y Arg-Trp-Ala-Gly-Val-Pro-Phe-Tyr-Bra-Arg-Thr-Gly-Lys-Arg, y que en la posición 321 o respectivamente en una posición correspondiente o comparable de la secuencia de aminoácidos contiene cualquier aminoácido exceptuando la glicina, de manera preferida la L-serina. Eventualmente, la secuencia de aminoácidos contiene además de esto un intercambio de aminoácidos de L-serina por otro aminoácido proteinógeno, de manera preferida la L-treonina, en la posición 8 de acuerdo con la SEQ ID NO:2.

El motivo de secuencia de aminoácidos Val-Ile-Phe-Gly-Val-Thr-Gly-Asp-Leu está contenido, por ejemplo en la SEQ ID NO:6, 8 o 10 desde la posición 32 hasta la 40. El motivo de secuencia de aminoácidos Arg-Ile-Asp-His-Tyr-Leu-Gly-Lys está contenido, por ejemplo en la SEQ ID NO:6, 8 o respectivamente 10 desde la posición 203 hasta la 210. El motivo de secuencia de aminoácidos Arg-Trp-Ala-Gly-Val-Pro-Phe-Tyr-Leu-Arg-Thr-Gly-Lys-Arg está contenido por ejemplo en las SEQ ID NO:6, 8 o 10 desde la posición 354 hasta la 367.

Finalmente, son objeto del invento unos mutantes de bacterias corineformes, que contienen un alelo de zwf, que codifica un polipéptido con la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que abarca la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6 o de la SEQ ID NO:8 o respectivamente de la SEQ ID NO:10.

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

Por el concepto de "una posición correspondiente a la posición 321 de la secuencia de aminoácidos" o de "una posición comparable a la posición 321 de la secuencia de aminoácidos" se entiende el hecho de que mediante una
10 inserción o supresión de un codón que codifica un aminoácido en la región terminal de N (referida a la posición 321 de las SEQ ID NO:6, 8 o 10) del polipéptido codificado, el dato sobre la posición y el dato sobre la longitud se aumentan formalmente en una unidad en el caso de una inserción, o se disminuyen en una unidad en el caso de una supresión. Por ejemplo, mediante supresión del codón AAC, que codifica el aminoácido L-asparagina, en la posición 4 de la SEQ ID NO:6, 8 o 10, la L-serina se desplaza desde la posición 321 hasta la posición 320. El dato sobre la
15 longitud sería entonces: 513 aminoácidos. De igual manera mediante una inserción o supresión de un codón que codifica un aminoácido en la región del terminal de C (referida a la posición 321) del polipéptido codificado, el dato sobre la longitud en el caso de una inserción se aumenta formalmente en una unidad, o en el caso de una supresión se disminuye en una unidad. Tales posiciones comparables se pueden identificar fácilmente mediante una comparación de las secuencias de aminoácidos en forma de una alineación (en inglés "alignment"), por ejemplo con ayuda del programa Clustal.

La actividad enzimática no es afectada esencialmente por tales inserciones y supresiones. El concepto de "no es afectada esencialmente" significa que la actividad enzimática de las mencionadas variantes se modifica como máximo en un 5 %, como máximo en un 2,5 % o como máximo en un 1 % de la actividad del polipéptido con la
25 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6 u 8 o respectivamente 10.

De una manera correspondiente, son objeto del invento también unos alelos de zwf, que codifican unas variantes de polipéptidos de la SEQ ID NO:6 u 8 o respectivamente 10, que contiene una o como máximo 5, como máximo 4, como máximo 3 o como máximo 2 inserción/inserciones o supresión/supresiones de aminoácidos.

30 Los motivos de secuencias de aminoácidos Val-Ile-Phe-Gly-Ali-Afa-Gly-Asp-Leu, y Arg-Ile-Asp-His-Tyr-Leu-Gly-Lys y Arg-Trp-Ala-Gly-Val-Pro-Phe-Tyr-Bra-Arg-Thr-Gly-Lys-Arg no son rotos por tales inserciones/supresiones.

Para la producción de los mutantes conformes al invento se pueden utilizar procedimientos clásicos de mutagénesis
35 in vivo con unas poblaciones celulares de bacterias corineformes mediante utilización de sustancias mutágenas tales como, por ejemplo, la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), el metanosulfonato de etilo (EMS), el 5-bromouracilo, o de una 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
40 Tosaka y colaboradores (Agricultural and Biological Chemistry 42 (4), 745-752 (1978), o en la cita de Konicek y colaboradores (Folia Microbiologica 33, 337-343 (1988)). Unas mutagénesis típicas mediante utilización de MNNG comprenden unas concentraciones de 50 a 500 mg/l o también unas concentraciones más altas de hasta como máximo 1 g/l, y un período de tiempo de incubación de 1 a 30 minutos a un pH de 5,5 a 7,5. En estas condiciones, el número de las células capaces de vivir es reducido en una proporción de aproximadamente 50 % a 90 % o de
45 aproximadamente 50 % a 99 % o de aproximadamente 50 % a 99,9 o más %.

A partir de la población celular mutagenizada se sacan y multiplican mutantes o respectivamente células. De manera preferida, en otra etapa adicional se investiga su capacidad de segregar aminoácidos, de manera preferida L-lisina o L-triptófano, en un cultivo por tandas (en inglés "batch") mediante utilización de un medio nutritivo adecuado. Unos
50 adecuados medios nutritivos y unas adecuadas condiciones de ensayo se describen, entre otros, en los documentos US 6.221.636, US 5.840.551, US 5.770.409, US 5.605.818, US 5.275.940 y US 4.224.409. En los casos de utilizaciones de unas instalaciones robóticas apropiadas, tales como las que se describen por ejemplo en la cita de Zimmermann y colaboradores (VDI Berichte n° 1.841, editorial VDI, Düsseldorf, Alemania 2004, 439-443) o de Zimmermann (Chemie Ingenieur Technik 77 (4), 426-428 (2005)), se pueden investigar numerosos mutantes en un
55 breve período de tiempo. Por lo general, se investigan como máximo 3.000, como máximo 10.000, como máximo 30.000 o también como máximo 60.000 mutantes y eventualmente también más. De esta manera son identificados unos mutantes que, en comparación con la cepa parental o respectivamente con la cepa de partida no mutagenizada, segregan aminoácidos de manera multiplicada al medio nutritivo o al interior de las células. A éstos pertenecen, por ejemplo, aquellos mutantes cuya secreción de aminoácidos se ha aumentado por lo menos en un
60 0,5 %.

A continuación, a partir de los mutantes se pone a disposición o respectivamente se aísla un ADN, y con ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa mediante utilización de unos pares de cebadores, que permiten la
65 amplificación del gen zwf o respectivamente del alelo de zwf conforme al invento o de la mutación conforme al invento en la posición 321, se sintetiza el correspondiente polinucleótido. De manera preferida, el ADN se aísla a

partir de aquellos mutantes, que, en comparación con la cepa de partida, segregan aminoácidos en una manera aumentada.

A este fin, se pueden escoger unos pares de cebadores arbitrarios a partir de la secuencia de nucleótidos situada corriente arriba y corriente abajo de la mutación conforme al invento, y de la secuencia de nucleótidos complementaria con respecto a aquella. Un cebador de un par de cebadores comprende en este caso de manera preferida por lo menos 15, por lo menos 18, por lo menos 20, por lo menos 21 o por lo menos 24 nucleótidos consecutivos, escogidos entre la secuencia de nucleótidos situada entre las posiciones 1 y 1.267 de la SEQ ID NO: 3 o de la SEQ ID NO:11. 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 2.100 y 1.271 de la SEQ ID NO: 3 o de la SEQ ID NO:11. Si se desea la amplificación de la región codificadora, entonces el par de cebadores se escoge de manera preferida a partir de la secuencia de nucleótidos, que se encuentra entre las posiciones 1 y 307 de la SEQ ID NO:3 o de la SEQ ID NO:11, y a partir de la secuencia complementaria de nucleótidos situada entre las posiciones 2.100 y 1.850 de la SEQ ID NO:3 o de la SEQ ID NO:11. Si se desea la amplificación de una parte de la región codificadora, tal como se representa a modo de ejemplo en las SEQ ID NO:14 y 15, entonces el par de cebadores se escoge de manera preferida a partir de la secuencia de nucleótidos que se encuentra entre las posiciones 309 y 1.267 de la SEQ ID NO: 3 o de la SEQ ID NO:11, y a partir de la secuencia complementaria de nucleótidos que se encuentra entre las posiciones 1.848 y 1.271 de la SEQ ID NO: 3 o de la SEQ ID NO:11. Unos adecuados pares de cebadores son por ejemplo el par de cebadores zwf-K1 y zwf-K2 reproducido bajo la SEQ ID NO:17 y la SEQ ID NO:18, o el par de cebadores zwf-L1 y zwf-L2 reproducido bajo la SEQ ID NO:19 y la SEQ ID NO:20. Además de esto, el cebador puede ser provisto de unos sitios de reconocimiento para enzimas de restricción, de un grupo de biotina o de otros elementos accesorios, tales como los que se describen dentro del estado de la técnica. La longitud total del cebador es por lo general como máximo de 30, 40, 50 ó 60 nucleótidos.

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

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

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

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

30 hasta 35 veces, eventualmente hasta 50 veces. Una etapa final de extensión durante 4 - 10 minutos finaliza la reacción. Los polinucleótidos producidos de esta manera son designados también como materiales amplificados; el concepto de fragmento de ácido nucleico es asimismo habitual.

5 Otras instrucciones e informaciones adicionales acerca de la PCR las encontrará un experto en la especialidad, por ejemplo, en el manual "PCR-Strategies" (Estrategias de PCR) (Innis, Felfand y Sninsky, Academic Press, Inc., 1995), en el manual de Diefenbach y Dveksler "PCR Primer - a laboratory manual" (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" (editorial Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Alemania, 1994).

15 La secuencia de nucleótidos se determina a continuación, por ejemplo, según el procedimiento de rotura de la cadena de Sanger y colaboradores (Proceedings of the National Academies of Sciences, EE.UU., 74, 5463-5467 (1977)) con las modificaciones indicadas por Zimmermann y colaboradores (Nucleic Acids Research 18, páginas 1067 y siguientes (1990)), y se analiza el polipéptido codificado por esta secuencia de nucleótidos en particular en lo que respecta a la secuencia de aminoácidos. Para esto, la secuencia de nucleótidos se introduce en un programa para la traducción de una secuencia de ADN en una secuencia de aminoácidos. Unos programas adecuados son, por ejemplo, el programa "Patentin", que es obtenible de las oficinas de patentes, por ejemplo de la Oficina de patentes de los EE.UU. (USPTO), o la herramienta de traducción "Translate Tool", que está disponible en el Servidor ExPASy Proteomics en el world wide web (internet) (Gasteiger y colaboradores, Nucleic Acids Research 31, 3784-3788 (2003)).

25 De esta manera se identifican unos mutantes, cuyos alelos de zwf codifican unos polipéptidos con la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que en la posición 321 de la secuencia de aminoácidos, o respectivamente de la posición correspondiente o comparable, contienen cualquier aminoácido proteinógeno exceptuando la glicina. Se prefiere el intercambio por L-serina. Eventualmente, la secuencia de aminoácidos contiene además un intercambio de aminoácidos de L-serina por otro aminoácido proteinógeno, de manera preferida L-treonina, en la posición 8 o respectivamente en la posición correspondiente o comparable.

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

a) tratamiento de una bacteria corineforme, que posee la capacidad de segregar aminoácidos, con un agente mutágeno,

b) aislamiento y multiplicación del mutante producido en a)

c) puesta a disposición de un ácido nucleico procedente del mutante obtenido en b)

40 d) producción de una molécula de ácido nucleico / un material amplificado / un fragmento de ácido nucleico mediando utilización de la reacción en cadena de la polimerasa, del ácido nucleico procedente de c), y de un par de cebadores, que se compone de un primer cebador que comprende por lo menos 15 nucleótidos consecutivos escogidos a partir de la secuencia de nucleótidos que se encuentra entre las posiciones 1 y 1.267 de la SEQ ID NO: 3 o de la SEQ ID NO:11, y de un segundo cebador, que comprende por lo menos 15 nucleótidos consecutivos, escogidos a partir de la secuencia complementaria de nucleótidos que se encuentra entre las posiciones 2.100 y 1.271 de la SEQ ID NO: 3 o 11.

e) determinación de la secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico obtenida en e), y determinación de la secuencia de aminoácidos codificada.

f) eventualmente comparación de la secuencia de aminoácidos determinada en f) con las SEQ ID NO: 6, 8 o 10, e

55 g) identificación de un mutante, que contiene un polinucleótido, que codifica un polipéptido con la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que contiene L-serina en la posición correspondiente a la posición 321 de la SEQ ID NO:2.

60 Los mutantes producidos de este modo contienen típicamente una (1) copia del alelo de zwf descrito. En las SEQ ID NO:5, 7 y 9 se reproducen a modo de ejemplo las regiones codificadoras de los alelos de zwf de unos mutantes conformes al invento. La región codificadora del gen de tipo silvestre se reproduce como la SEQ ID NO:1. La SEQ ID NO:1 contiene en la posición 961 la nucleobase guanina, en la posición 962 la nucleobase guanina y en la posición 963 la nucleobase citosina. La SEQ ID NO:1 contiene en las posiciones 961 hasta 963 el codón GGC que codifica el aminoácido glicina. La SEQ ID NO:5 contiene en la posición 961 la nucleobase adenina. Mediante esta transición de guanina a adenina resulta en las posiciones 961 hasta 963 el codón AGC que codifica el aminoácido L-serina.

La SEQ ID NO:1 contiene en la posición 22 la nucleobase timina, en la posición 23 la nucleobase citosina y en la posición 24 la nucleobase citosina. La SEQ ID NO:1 contiene correspondientemente en las posiciones 22 hasta 24 el codón TCC que codifica el aminoácido serina. La SEQ ID NO:7 contiene en la posición 22 la nucleobase adenina. Por medio de esta transversión de timina a adenina resulta en las posiciones 22 hasta 24 el codón AGC que codifica el aminoácido L-serina.

Además de esto, las secuencias de nucleótidos representadas en las SEQ ID NO:5 y 7 pueden contener otros intercambios de bases, que han resultado por medio del tratamiento de mutagénesis, pero que no se exteriorizan en una secuencia modificada de aminoácidos. Tales mutaciones son designadas en el mundo especializado también como mutaciones mudas o neutras. Estas mutaciones mudas pueden estar contenidas asimismo en la bacteria corineforme que se emplea para el tratamiento de mutagénesis. Ejemplos de tales mutaciones mudas son la transición de citosina a timina en la posición 138, la transición de citosina a timina en la posición 279, la transición de timina a citosina en la posición 738, la transición de citosina a timina en la posición 777 y la transición de guanina a adenina en la posición 906 tal como se representa en la SEQ ID NO: 9.

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

Las bacterias corineformes productoras de L-lisina, poseen típicamente una aspartato cinasa resistente a la retroalimentación (en inglés "feed back") o respectivamente desensibilizada. Por el concepto de "aspartato cinasas resistentes frente a la retroalimentación" se entienden unas aspartato cinasas que, en comparación con la forma silvestre, tienen una sensibilidad más pequeña frente a la inhibición por mezclas de lisina y treonina o por mezclas de AEC (aminoetilcisteína) y treonina, o por lisina a solas o por AEC a solas. Los genes o respectivamente alelos que codifican estas aspartato cinasas desensibilizadas son designados también como alelos de $lysC^{FBR}$. Dentro del estado de la técnica (Tabla 1) se describen numerosos alelos de $lysC^{FBR}$, que codifican unas variantes de la aspartato cinasa, que poseen intercambios de aminoácidos en comparación con la proteína de tipo silvestre. La región codificadora del gen $lysC$ de tipo silvestre de *Corynebacterium glutamicum* correspondiente al número de acceso AX756575 en el banco de datos NCBI se representa en la SEQ ID NO:21 y la proteína codificada por este gen se representa en la SEQ ID NO: 22.

Tabla 1

Alelos de $lysC^{FBR}$, que codifican aspartato cinasas resistentes frente a la retroalimentación			
Designación del alelo	Otros datos	Referencia	Número de acceso
$lysC^{FBR}$ -E05108		documento JP 1993184366-A (secuencia 1)	E05108
$lysC^{FBR}$ -E06825	$lysC$ A279T	documento JP 1994062866-A (secuencia 1)	E06825
$lysC^{FBR}$ -E06826	$lysC$ A279T	documento JP 1994062866-A (secuencia 2)	E06826
$lysC^{FBR}$ -E06827		documento JP 1994062866-A (secuencia 3)	E06827
$lysC^{FBR}$ -E08177		documento JP 1994261766-A (secuencia 1)	E08177
$lysC^{FBR}$ -E08178	$lysC$ A279T	documento JP 1994261766-A (secuencia 2)	E08178
$lysC^{FBR}$ -E08179	$lysC$ A279V	documento JP 1994261766-A (secuencia 3)	E08179
$lysC^{FBR}$ -E08180	$lysC$ S301F	documento JP 1994261766-A (secuencia 4)	E08180
$lysC^{FBR}$ -E08181	$lysC$ T308I	documento JP 1994261766-A (secuencia 5)	E08181
$lysC^{FBR}$ -E08182		documento JP 1994261766-A (secuencia 6)	E08182
$lysC^{FBR}$ -E12770		documento JP 1997070291-A (secuencia 13)	E12770
$lysC^{FBR}$ -E14514		documento JP 1997322774-A (secuencia 9)	E14514
$lysC^{FBR}$ -E16352		documento JP 1998165180-A (secuencia 3)	E16352
$lysC^{FBR}$ -E16745		documento JP 1998215883-A (secuencia 3)	E16745
$lysC^{FBR}$ -E16746		documento JP 1998215883-A (secuencia 4)	E16746
$lysC^{FBR}$ -I74588		documento US 5688671-A (secuencia 1)	I74588
$lysC^{FBR}$ -I74589	$lysC$ A279T	documento US 5688671-A (secuencia 2)	I74589
$lysC^{FBR}$ -I74590		documento US 5688671-A (secuencia 7)	I74590
$lysC^{FBR}$ -I74591	$lysC$ A279T	documento US 5688671-A (secuencia 8)	I74591
$lysC^{FBR}$ -I74592		documento US 5688671-A (secuencia 9)	I74592
$lysC^{FBR}$ -I74593	$lysC$ A279T	documento US 5688671-A (secuencia 10)	I74593
$lysC^{FBR}$ -I74594		documento US 5688671-A (secuencia 11)	I74594
$lysC^{FBR}$ -I74595	$lysC$ A279T	documento US 5688671-A (secuencia 12)	I74595
$lysC^{FBR}$ -I74596		documento US 5688671-A (secuencia 13)	I74596
$lysC^{FBR}$ -I74597	$lysC$ A279T	documento US 5688671-A (secuencia 14)	I74597
$lysC^{FBR}$ -X57226	$lysC$ S301Y	documento EP 0387527 Kalinowski y colaboradores, Molecular and General Genetics 224:317-324 (1990)	X57226
$lysC^{FBR}$ -L16848	$lysC$ G345D	Folletie y Sinskey Base de datos de nucleótidos del NCBI (1990)	L16848

lysC ^{FBR} -L27125	lysC R320G lysC G345D	Jetten y colaboradores, Applied Microbiology Biotechnology 43:76-82 (1995)	L27125
lysC ^{FBR}	lysC T311I	documento WO0063388 (secuencia 17)	
lysC ^{FBR}	lysC S301F	documento US 3732144	
lysC ^{FBR}	lysC S381F	documento EP 0435132	
lysC ^{FBR}	lysC S317A	documento US 5688671 (secuencia 1)	
lysC ^{FBR}	lysC T380I	documento WO 01/49854	

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

5 Se prefieren los siguientes alelos de lysC^{FBR}: lysC A279T (intercambio de alanina en la posición 279 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 22 por treonina), lysC A279V (intercambio de alanina en la posición 279 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 22 por valina), lysC S301F (intercambio de serina en la posición 301 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 22 por fenilalanina), lysC T308I (intercambio de treonina en la posición 308 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 22 por isoleucina), lysC S301Y (intercambio de serina en la posición 308 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 22 por tirosina), lysC G345D (intercambio de glicina en la posición 345 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 22 por ácido aspártico), lysC R320G (intercambio de arginina en la posición 320 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 22 por glicina), lysC T311I (intercambio de treonina en la posición 311 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 22 por isoleucina), lysC S381F (intercambio de serina en la posición 381 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 22 por fenilalanina) y lysC S317A (intercambio de serina en la posición 317 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 22 por alanina).

20 Se prefieren especialmente el alelo de lysC^{FBR} lysC T311I (intercambio de treonina en la posición 311 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 22 por isoleucina), y un alelo de lysC^{FBR} que contiene por lo menos un intercambio, escogido entre el conjunto que se compone de A279T (intercambio de alanina en la posición 279 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 22 por treonina), de S381F (intercambio de serina en la posición 381 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 22 por fenilalanina) y de S317A (intercambio de serina en la posición 317 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 22 por alanina).

30 El alelo de lysC^{FBR} lysC T311I está contenido en la cepa DM1797 depositada en la DSMZ. El DM1797 es un mutante de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032.

La cepa NRRL B-11474 posee un alelo de lysC^{FBR}, que codifica una proteína aspartato cinasa, que contiene los intercambios de aminoácidos A279T y S381F.

35 Según el modo descrito más arriba, partiendo de la cepa DM1797, se aísla un mutante designado como DM1816, que contiene un alelo de zwf, que codifica un polipéptido, en el que en la posición 321 de la secuencia de aminoácidos está contenida la L-serina. La secuencia de nucleótidos de la región codificadora del alelo de zwf del mutante DM1816 se representa como la SEQ ID NO:9 y la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado se representa como la SEQ ID NO:10 o respectivamente 12. El mutante DM1816 contiene además de esto unos intercambios de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1 y 307 de la SEQ ID NO:3. Estos intercambios de nucleótidos se representan en la SEQ ID NO:11. La SEQ ID NO:11 contiene en la posición 208 guanina en lugar de adenina, en la posición 235 adenina en lugar de guanina, en la posición 245 citosina en lugar de timina, en la posición 257 guanina en lugar de adenina y en la posición 299 guanina en lugar de adenina. La SEQ ID NO:11 contiene además en la posición 329 adenina en lugar de timina, en la posición 445 timina en lugar de citosina, en la posición 586 timina en lugar de citosina, en la posición 1.045 citosina en lugar de timina, en la posición 1.084 timina en lugar de citosina, en la posición 1.213 adenina en lugar de guanina y en la posición 1.268 adenina en lugar de guanina.

50 Según el modo descrito más arriba, partiendo de la cepa NRRL B-11474, se aísla un mutante designado como DM1889, que contiene un alelo de zwf, que codifica un polipéptido, en el que en la posición 321 de la secuencia de aminoácidos está contenida la L-serina.

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

Las bacterias corineformes productoras de L-triptófano poseen típicamente una antranilato sintasa resistente a la retroalimentación o respectivamente desensibilizada. Por el concepto de "antranilato sintasa resistente a la

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

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

Es un objeto del invento asimismo un polinucleótido aislado, que codifica un polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO:2 con la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que en la posición 321 de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 contiene L-serina.

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

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

En el caso de los polinucleótidos aislados se puede tratar por ejemplo del ADN total aislado o respectivamente del ADN cromosomal aislado o también de unos materiales amplificados del gen *zwf*, que se habían producido con ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Tales materiales amplificados son designados también como productos de la PCR. Unas instrucciones para realizar la amplificación de secuencias de ADN con ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa las encontrará un experto en la especialidad, entre otros lugares, en el manual de Gait: *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (Síntesis de oligonucleótidos: un enfoque práctico) (IRL Press, Oxford, Reino Unido, 1984) y en la cita de Newton y Graham: PCR (editorial Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Alemania, 1994). Asimismo es posible introducir el gen *zwf* que debe de ser mutagenizado, primeramente en un vector, por ejemplo en un bacteriófago o en un plásmido.

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

Instrucciones y recopilaciones adicionales acerca de la producción de mutaciones in vivo o in vitro se pueden tomar del estado de la técnica y de los libros de texto conocidos de genética y de biología molecular, tales como por ejemplo el libro de texto de Knippers ("*Molekulare Genetik*" (Genética molecular), 6ª edición, editorial Georg Thieme, Stuttgart, Alemania, 1995)), el de Winnacker ("*Gene und Klone*" (Genes y clones), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1990) o el de Hagemann ("*Allgemeine Genetik*" (Genética general), editorial Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986). Un objeto del invento es además un polinucleótido aislado, que codifica un polipéptido con la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que contiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2, estando contenida la L-serina en la posición 321 de la secuencia de aminoácidos. Eventualmente, la secuencia de aminoácidos del polipéptido contiene además de esto un intercambio de aminoácidos de L-serina por otro aminoácido, de manera preferida L-treonina, en la posición 8.

La descripción divulga además un polinucleótido aislado, que codifica un polipéptido con la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que abarca una secuencia de aminoácidos con una longitud de 514 aminoácidos, y estando contenido en la posición 321 cualquier L-aminoácido proteinógeno exceptuando la glicina, de manera preferida L-serina.

La descripción divulga además un polinucleótido aislado, que codifica un polipéptido con la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que contiene desde la posición 312 hasta la 330 de la secuencia de aminoácidos la secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 312 hasta 330 de la SEQ ID NO:6 u 8. De manera preferida, la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado contiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 307 hasta 335 de la SEQ ID NO:6 u 8 o a las posiciones 292 hasta 350 de la SEQ ID NO:6 u 8 o a las posiciones 277 hasta 365 de la SEQ ID NO:6 u 8 o a las posiciones 262 hasta 380 de la SEQ ID NO:6 u 8 o a las posiciones 247 hasta 395 de la SEQ ID NO:6 u 8 o a las posiciones 232 hasta

410 de la SEQ ID NO:6 u 8 o a las posiciones 202 hasta 440 de la SEQ ID NO:6 u 8 o a las posiciones 172 hasta 470 de la SEQ ID NO:6 u 8 o a las posiciones 82 hasta 500 de la SEQ ID NO:6 u 8 o a las posiciones 2 hasta 512 de la SEQ ID NO:6 u 8 o a las posiciones 2 hasta 513 de la SEQ ID NO:6 u 8 o a las posiciones 2 hasta 514 de la SEQ ID NO: 6 u 8. De manera muy especialmente preferida, la longitud del polipéptido codificado abarca 514 aminoácidos.

La descripción divulga además un polinucleótido aislado, que codifica un polipéptido con la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que en la posición 321 de la secuencia de aminoácidos o respectivamente en una posición correspondiente o comparable contiene cualquier aminoácido proteinógeno exceptuando la glicina, de manera preferida L-serina, y que abarca una secuencia de nucleótidos, que es idéntica a la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido, que es obtenible mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediando utilización del par de cebadores, cuyas secuencias de nucleótidos abarcan en cada caso por lo menos 15 nucleótidos consecutivos, que se escogen a partir de la secuencia de nucleótidos, que se encuentra entre las posiciones 1 y 307 de la SEQ ID NO:3 o de la SEQ ID NO:11 y a partir de la secuencia complementaria de nucleótidos, que se encuentra entre las posiciones 2.100 y 1.850 de la SEQ ID NO: 3 o de la SEQ ID NO:11. Ejemplos de adecuados pares de cebadores se exponen en las SEQ ID NO:17 y SEQ ID NO:18 y en las SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO:20. Como material de partida (ADN de molde) se prefiere un ADN cromosomal de bacterias corineformes, que han sido tratadas en particular con un agente mutágeno. Se prefiere especialmente el ADN cromosomal del género *Corynebacterium* y se prefiere muy especialmente el de la especie *Corynebacterium glutamicum*.

La descripción divulga además un polinucleótido aislado, que se hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos complementaria con respecto a la SEQ ID NO: 5, 7 o 9, y que codifica un polipéptido con la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que en la posición 321 de la secuencia de aminoácidos o respectivamente en una posición correspondiente o comparable contiene cualquier aminoácido proteinógeno exceptuando la glicina, de manera preferida L-serina, y eventualmente en una posición correspondiente a la posición 8 contiene cualquier aminoácido proteinógeno exceptuando la L-serina, de manera preferida L-treonina.

Instrucciones para realizar la hibridación de ácidos nucleicos o respectivamente de polinucleótidos, las puede encontrar un experto en la especialidad, entre otros, en el manual "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" (Guía para usuarios del sistema DIG para la hibridación en filtro) de la entidad Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania, 1993) y en la cita de Liebl y colaboradores (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). La hibridación tiene lugar en condiciones rigurosas, es decir que sólo se forman unos híbridos, en los que la sonda, es decir un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos complementaria a las SEQ ID NO: 5, 7 o 9, y la secuencia diana, es decir los polinucleótidos que han sido tratados o respectivamente identificados con la sonda, son idénticas por lo menos en un 90 %. Es conocido que la rigurosidad de la hibridación, inclusive las etapas de lavado, puede ser influida o respectivamente determinada mediante variación de la composición del tampón, de la temperatura y de la concentración de sales. La reacción de hibridación se lleva a cabo en general con una rigurosidad relativamente baja en comparación con las etapas de lavado (Hybaid Hybrisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, Reino Unido, 1996).

Para la reacción de hibridación se puede emplear, por ejemplo, un tampón correspondiente al tampón 5x SSC, a una temperatura de aproximadamente 50°C - 68°C. En este caso, unas sondas se pueden hibridar también con unos polinucleótidos, que tienen una identidad de menos que un 90 % con la secuencia de nucleótidos de la sonda empleada. Tales híbridos son menos estables y son eliminados mediante lavado en condiciones rigurosas. Esto se puede conseguir, por ejemplo, mediante disminución de la concentración de sales hasta 2x SSC y eventualmente a continuación hasta 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania, 1995), ajustándose una temperatura de aproximadamente 50°C - 68°C, aproximadamente 52°C - 68°C, aproximadamente 54°C - 68°C, aproximadamente 56°C - 68°C, aproximadamente 58°C - 68°C, aproximadamente 60°C - 68°C, aproximadamente 62°C - 68°C, aproximadamente 64°C - 68°C y aproximadamente 66°C - 68°C. Se prefieren los intervalos de temperaturas de aproximadamente 64°C - 68°C o aproximadamente 66°C - 68°C. Eventualmente es posible disminuir la concentración de sales hasta una concentración correspondiente a 0,2x SSC o 0,1x SSC. Eventualmente, el tampón SSC contiene dodecilsulfato de sodio (SDS) en una concentración de 0,1 %. Mediante un aumento escalonado de la temperatura de hibridación en escalones de aproximadamente 1 - 2°C, desde 50°C hasta 68°C, se pueden aislar unos fragmentos de polinucleótidos, que poseen una identidad de por lo menos un 90 % o de por lo menos un 91 %, de manera preferida de por lo menos un 92 % o de por lo menos un 93 % o de por lo menos un 94 % o de por lo menos un 95 % o de por lo menos un 96 %, y de manera especialmente preferida de por lo menos un 97 % o de por lo menos un 98 % o de por lo menos un 99 % con la secuencia o respectivamente con la secuencia complementaria de la sonda empleada, y que codifican un polipéptido con la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que contiene el intercambio de aminoácidos conforme al invento. La secuencia de nucleótidos del polinucleótido obtenido de esta manera se determina con métodos conocidos. Otras instrucciones para realizar la hibridación son obtenibles en el mercado en forma de los denominados estuches (por ejemplo el DIG Easy Hyb de la entidad Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, n° de catálogo 1603558). Las secuencias de nucleótidos obtenidas de esta manera codifican unos polipéptidos con la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que son idénticos en por lo menos un 90 %, de manera preferida en por lo menos un 92 % o en por lo menos un 94 % o en por lo menos un 96 %, y de manera muy

especialmente preferida en por lo menos un 97 % o en por lo menos un 98 % o en por lo menos un 99 % con la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8, que contienen los intercambios de aminoácidos conformes al invento.

La descripción divulga además de esto un polinucleótido aislado, que codifica un polipéptido con la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que en la posición 321 o respectivamente en una posición correspondiente o comparable de la secuencia de aminoácidos contiene cualquier aminoácido exceptuando la glicina, dándose la preferencia al intercambio por L-serina, y que abarca una secuencia de aminoácidos que además de esto es idéntica por lo menos en un 90 %, de manera preferida por lo menos en un 92 % o por lo menos en un 94 % o por lo menos en un 96 %, y de manera muy especialmente preferida por lo menos en un 97 % o por lo menos en un 98 % o por lo menos en un 99 % a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 6. Un ejemplo de un polipéptido con la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que abarca una secuencia de aminoácidos, que es idéntica por lo menos en un 99 % con la de la SEQ ID NO:6, se muestra en las SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:10.

La descripción divulga además de esto un polinucleótido aislado, que codifica un polipéptido con la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que en la posición 321 o respectivamente en una posición correspondiente o comparable de la secuencia de aminoácidos contiene cualquier aminoácido exceptuando la glicina, dándose la preferencia al intercambio por L-serina y que abarca una secuencia de nucleótidos, que además de esto es idéntica por lo menos en un 90 %, de manera preferida por lo menos en un 92 % o por lo menos en un 94 % o por lo menos en un 96 %, y de manera muy especialmente preferida por lo menos en un 97 % o por lo menos en un 98 % o por lo menos en un 99 % a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:5. Un ejemplo de un polinucleótido, que codifica un polipéptido con la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, y que posee una secuencia de nucleótidos que es idéntica por lo menos en un 99 % con la de la SEQ ID NO:5, se muestra en la SEQ ID NO:7. La secuencia de nucleótidos de este alelo de zwf posee, adicionalmente al intercambio de nucleótidos de guanina por adenina en la posición 961 (véase la SEQ ID NO:5), el intercambio de nucleótidos de timina por adenina en la posición 22 (véase la SEQ ID NO:7). Otro ejemplo adicional de una secuencia de nucleótidos de un alelo de zwf, que posee una identidad de por lo menos un 99 % con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:5, se muestra en la SEQ ID NO:9. La secuencia de nucleótidos de este alelo de zwf posee, adicionalmente al intercambio de nucleótidos de guanina por adenina en la posición 961 (véase la SEQ ID NO:5) y al intercambio de nucleótidos de timina por adenina en la posición 22 (véase la SEQ ID NO:7), los intercambios de nucleótidos de citosina por timina en la posición 138, de citosina por timina en la posición 279, de timina por citosina en la posición 738, de citosina por timina en la posición 777 y de guanina por adenina en la posición 906 (véase la SEQ ID NO:9).

Además de esto, se prefieren aquellos polinucleótidos aislados, que codifican un polipéptido con la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que en la posición 321 de la secuencia de aminoácidos o respectivamente en una posición correspondiente o comparable contiene cualquier aminoácido exceptuando la glicina, de manera preferida L-serina, y que contienen por lo menos un motivo de secuencia o respectivamente una secuencia de aminoácidos que se escoge entre el conjunto que se compone de Val-Ile-Phe-Gly-Ali-Afa-Gly-Asp-Leu, Arg-Ile-Asp-His-Tyr-Leu-Gly-Lys, y Arg-Trp-Ala-Gly-Val-Pro-Phe-Tyr-Bra-Arg-Thr-Gly-Lys-Arg.

La designación "Ali" representa a los aminoácidos Ala o Val, la designación "Afa" representa a los aminoácidos Lys o Thr y la designación "Bra" representa a los aminoácidos Ile o Leu.

Es objeto del invento además de esto un polinucleótido aislado, que codifica un polipéptido con la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que abarca la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6 u 8 o respectivamente 10.

La descripción divulga además de esto un polinucleótido aislado, que codifica un polipéptido con la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que abarca la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6 u 8 o respectivamente 10, inclusive una prolongación junto al extremo terminal de N o C en por lo menos un (1) aminoácido. Esta prolongación no es de más que 50, 40, 30, 20, 10, 5, 3 ó 2 aminoácidos o respectivamente restos de aminoácidos.

Finalmente son también un objeto del invento unos alelos de zwf, que codifican las variantes de polipéptidos de la SEQ ID NO:6, 8 o 10, que contienen una o como máximo 5, como máximo 4, como máximo 3 o como máximo 2 inserción/inserciones de aminoácidos y que contienen L-serina en la posición correspondiente a la posición 321. Los motivos de secuencia Val-Ile-Phe-Gly-Ali-Afa-Gly-Asp-Leu y/o Arg-Ile-Asp-His-Tyr-Leu-Gly-Lys y/o Arg-Trp-Ala-Gly-Val-Pro-Phe-Tyr-Bra-Arg-Thr-Gly-Lys-Arg de manera preferida no son rotos por tales inserciones/supresiones.

Además es un objeto del invento un polinucleótido aislado, que abarca la secuencia de nucleótidos de acuerdo con las SEQ ID NO:5, 7, 9 u 11.

La descripción divulga además un polinucleótido aislado, que abarca la secuencia de nucleótidos que se encuentra entre las posiciones 1 y 307 de la SEQ ID NO:11, de manera preferida la secuencia de nucleótidos que se encuentra

entre las posiciones 198 y 304 de la SEQ ID NO:11 y de manera muy especialmente preferida la secuencia de nucleótidos que se encuentra entre las posiciones 208 y 299 de la SEQ ID NO:11.

Finalmente, es un objeto del invento un polinucleótido aislado que contiene el alelo de zwf del mutante DM1816.

Además de esto es un objeto del invento un polinucleótido aislado, que abarca una parte de la región codificadora de un alelo de zwf conforme al invento, abarcando el polinucleótido aislado en cualquier caso la parte de la región codificadora, que contiene el intercambio de aminoácidos en la posición 321 de la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado. En particular, se abarca una molécula de ácidos nucleicos o respectivamente un fragmento de ADN, que codifica por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 307 hasta 335 de la SEQ ID NO:2, o que codifica por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 292 hasta 350 de la SEQ ID NO:2, o que codifica por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 262 hasta 380 de SEQ ID NO:2, o que codifica por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 247 hasta 395 de la SEQ ID NO:2, o que codifica por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 232 hasta 410 de la SEQ ID NO: 2, o que codifica por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 202 hasta 440 de la SEQ ID NO:2, o que codifica por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 172 hasta 470 de la SEQ ID NO:2, o que codifica por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 82 hasta 500 de la SEQ ID NO:2, o que codifica por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 2 hasta 512 de la SEQ ID NO:2, o que codifica por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 2 hasta 513 de la SEQ ID NO:2, o que codifica por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 2 hasta 514 de la SEQ ID NO:2 o respectivamente que contiene un correspondiente marco de lectura, estando contenido en la posición correspondiente a la posición 321 de la SEQ ID NO:2 cualquier aminoácido proteinógeno exceptuando la glicina, de manera preferida L-serina, y estando contenido eventualmente en la posición correspondiente a la posición 8 cualquier aminoácido proteinógeno exceptuando la L-serina, de manera preferida L-treonina.

Un ejemplo de un marco de lectura conforme al invento abarca un polinucleótido, que codifica por lo menos la secuencia de aminoácidos que se encuentra en las posiciones 307 y 335 correspondientes a la SEQ ID NO:2, estando contenida la L-serina en la posición correspondiente a la posición 321 de la secuencia de aminoácidos, se expone seguidamente:

```
gat aaa acc tcc gct cgt ggt cag tac gct gcc ggt tgg cag
Asp Lys Thr Ser Ala Arg Gly Gln Tyr Ala Ala Gly Trp Gln
307          310          315          320
```

```
nnn tct gag tta gtc aag gga ctt cgc gaa gaa gat ggc ttc aac
Xaa Ser Glu Leu Val Lys Gly Leu Arg Glu Glu Asp Gly Phe Asn
          325          330          335
```

Asimismo él se representa como la SEQ ID NO:13. La secuencia de aminoácidos codificada por este marco de lectura se representa como la SEQ ID NO:14. La posición 15 en la SEQ ID NO:14 corresponde a la posición 321 de la SEQ ID NO:6, 8, 10 o 12.

Se prefieren unas moléculas de ácidos nucleicos, que codifican por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 307 hasta 335 de la SEQ ID NO:6 u 8 o respectivamente 10.

Un ejemplo de un marco de lectura conforme al invento que abarca un polinucleótido, que codifica por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 307 hasta 335 de la SEQ ID NO:6, se expone a continuación:

```
gat aaa acc tcc gct cgt ggt cag tac gct gcc ggt tgg cag
Asp Lys Thr Ser Ala Arg Gly Gln Tyr Ala Ala Gly Trp Gln
307          310          315          320
```

```
agc tct gag tta gtc aag gga ctt cgc gaa gaa gat ggc ttc aac
Ser Ser Glu Leu Val Lys Gly Leu Arg Glu Glu Asp Gly Phe Asn
          325          330          335
```

El marco de lectura se representa asimismo como la SEQ ID NO:15. La SEQ ID NO:16 muestra la secuencia de aminoácidos codificada por este marco de lectura. La posición 15 en la SEQ ID NO:16 corresponde a la posición 321 de las SEQ ID NO:6, 8, 10 o 12.

- 5 Se prefieren muy especialmente unas moléculas de ácidos nucleicos, que abarcan por lo menos una secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 919 hasta 1.005 de las SEQ ID NO:5, 7 o 9.

Los marcos de lectura conformes al invento, tal como se muestran a modo de ejemplo en las SEQ ID NO:13 y 15 como una secuencia de nucleótidos y en las SEQ ID NO:14 y SEQ ID NO:16 en forma de la secuencia de aminoácidos codificada, pueden contener además de esto una o varias mutación/mutaciones, que da(n) lugar a uno o varios intercambios conservativos de aminoácidos. De manera preferida, las mutaciones dan lugar a como máximo un 4 %, como máximo un 2 % o como máximo un 1 % de intercambios conservativos de aminoácidos. Además, los marcos de lectura conformes al invento pueden contener una o varias mutaciones mudas. De manera preferida, los marcos de lectura conformes al invento contienen como máximo un 4 % y de manera especialmente preferida desde como máximo un 2 % hasta como máximo un 1 % de mutaciones mudas.

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

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

Este método fue utilizado por Schwarzer y Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991) para incorporar un alelo de lysA, que llevaba una supresión y para incorporar un alelo de lysA, que llevaba una inserción, en el cromosoma de *C. glutamicum* en lugar del gen de tipo silvestre. Este método fue empleado por Schäfer y colaboradores (Gene 145, 69-73 (1994)) para incorporar una supresión en el operón hom-thrB de *C. glutamicum*. Este método fue empleado por Nakagawa y colaboradores (documento EP 1108790) y por Ohnishi y colaboradores (Applied Microbiology and Biotechnology 58(2), 217-223 (2002)) para incorporar diferentes mutaciones, partiendo de los alelos 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 cepas de *C. glutamicum*.

Para un procedimiento conforme al invento se puede utilizar un polinucleótido conforme al invento, que abarca toda la región codificadora, tal como se expone por ejemplo en las SEQ ID NO: 5, 7 o 9, o que abarca una parte de la región codificadora, tal como, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos, que codifica por lo menos la secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 307 hasta 335 de la SEQ ID NO: 6, 8 o 10, y que se representan como las SEQ ID NO: 13 y 15. La parte de la región codificadora correspondiente a las SEQ ID NO: 13 y 15 tiene una longitud de ≥ 87 nucleobases. Se prefieren aquellas partes de la región codificadora, cuya longitud es de ≥ 267 nucleobases, tales como, por ejemplo, unas moléculas de ácidos nucleicos, que codifican por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 277 hasta 365 de la SEQ ID NO:6, 8 o respectivamente 10. Se prefieren muy especialmente aquellas partes de la región codificadora, cuya longitud es de ≥ 357 nucleobases, tales como por ejemplo unas moléculas de ácidos nucleicos que codifican por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 262 hasta 380 de la SEQ ID NO:6, 8 o 10.

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

Ejemplos de tales vectores de plásmidos son los vectores pK**mob* y pK**mobsacB*, tales como, por ejemplo el pK18*mobsacB*, descritos por Schäfer y colaboradores (Gene 145, 69-73 (1994)) y los vectores descritos en los documentos de solicitudes de patentes internacionales WO 02/070685 y WO 03/014362. Éstos son replicativos en *Escherichia coli*, pero no en bacterias corineformes. Se adecuan especialmente unos vectores, que contienen un gen que actúa de un modo dominante negativo condicional, tal como, por ejemplo, el gen *sacB* (gen de la levano sucraza) de, por ejemplo, *Bacillus*, o el gen *galK* (gen de la galactosa cinasa) de, por ejemplo, *Escherichia coli*. (Por el concepto de "un gen, que actúa de un modo dominante negativo condicional" se entiende un gen, que en determinadas condiciones es desventajoso, por ejemplo tóxico, para el anfitrión, pero que en otras condiciones no

tiene repercusiones negativas sobre el anfitrión que lleva el gen). Éstas hacen posible la selección en cuanto a unos sucesos de recombinación, en los que el vector es eliminado desde el cromosoma. Además de esto, por Nakamura y colaboradores (documento US-A-6.303.383) se describió un plásmido sensible frente a la temperatura para bacterias corineformes, que sólo se puede replicar a unas temperaturas situadas por debajo de 31°C.

El vector es transferido a continuación por conjugación, por ejemplo según el método de Schäfer (Journal of Bacteriology 172, 1663-1666 (1990)) o por transformación, por ejemplo según el método de Dunican y Shivan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) o según el método de Thierbach y colaboradores (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), a la bacteria corineforme. Eventualmente, la transferencia del ADN se puede alcanzar también mediante un bombardeo con partículas.

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

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

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

a) se transfiere un polinucleótido conforme al invento a una bacteria corineforme

b) el gen de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa presente en el cromosoma de la bacteria corineforme, que codifica una secuencia de aminoácidos con glicina en la posición 321 y eventualmente L-serina en la posición 8 o en una posición comparable de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2, se intercambia por el polinucleótido procedente de a),

c) se multiplica y reproduce la bacteria corineforme obtenida de acuerdo con las etapas a) y b).

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

Otro procedimiento para la producción de un microorganismo consiste en que

a) se transfiere un polinucleótido conforme al invento, que codifica un polinucleótido con la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, a un microorganismo.

b) el polinucleótido se replica en el microorganismo, y

c) se multiplica y reproduce el microorganismo obtenido de acuerdo con las etapas a) y b).

De esta manera se obtiene un microorganismo recombinante, que contiene por lo menos una (1) copia o varias copias de un polinucleótido conforme al invento, que codifica una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que en la posición 321 o en una posición comparable de la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado contiene cualquier aminoácido proteinógeno exceptuando la glicina, siendo preferido el intercambio por L-serina. Eventualmente, el polipéptido contiene en la posición 8 o en una posición comparable cualquier aminoácido proteinógeno exceptuando la L-serina, de manera preferida L-treonina.

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

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

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

sobreexpresan unos alelos de *zwf* o respectivamente unos polinucleótidos, que codifican unas glucosa-6-fosfato deshidrogenasas, que en la posición 321 de la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado contienen cualquier aminoácido proteinógeno exceptuando la glicina, siendo preferido el intercambio por L-serina. Eventualmente, la proteína codificada contiene además un intercambio de L-serina por otro aminoácido proteinógeno, de manera preferida L-treonina, en la posición 8 de la secuencia de aminoácidos. Es conocido que mediante unas enzimas propias del anfitrión - las denominadas aminopeptidasas - se pueden separar desde el polipéptido formado unos aminoácidos terminales de N, en particular la metionina terminal de N. El mencionado aumento de la concentración o de la actividad de un producto génico se puede conseguir por ejemplo aumentando el número de copias de los correspondientes polinucleótidos en por lo menos una copia.

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

Un artículo recopilativo sobre el tema de plásmidos en *Corynebacterium glutamicum* se encuentra en la cita de Tauch y colaboradores (*Journal of Biotechnology* 104, 27-40 (2003)).

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

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

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

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

Otro método para la consecución de una sobreexpresión consiste en unir el correspondiente gen o respectivamente alelo de un modo funcional (en inglés "operably linked" = enlazado operativamente) con un promotor o respectivamente una casete de expresión. Unos promotores adecuados para *Corynebacterium glutamicum* se describen, por ejemplo, en el artículo recopilativo de Patek y colaboradores (*Journal of Biotechnology* 104(1-3), 311-323 (2003)). Además, se pueden utilizar los promotores T3, T7, SP6, M13, *lac*, *tac* y *trc*, 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 tal promotor puede ser introducido, por ejemplo, corriente arriba del alelo de *zwf* conforme al invento, típicamente a una distancia de aproximadamente 1 - 500 o 1 - 307 nucleótidos desde el codón de iniciación, de una bacteria corineforme recombinante, que en lugar del aminoácido glicina presente de modo natural en la posición 321, contiene otro aminoácido proteinógeno. Un tal promotor se puede introducir naturalmente asimismo corriente arriba del alelo de *zwf* de un mutante conforme al invento. Además, es posible unir con un promotor a un polinucleótido aislado conforme al invento, que codifica una variante conforme al invento de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, e incorporar la unidad de expresión obtenida en un plásmido, que se replica extracromosomalmente, o en el cromosoma de una bacteria corineforme.

Además de esto, se pueden mutar las regiones de promotor y de regulación, o el sitio de fijación a ribosomas, que se encuentra corriente arriba del gen estructural. Un ejemplo de una región de promotor mutado del gen *zwf* o respectivamente del alelo de *zwf* es la secuencia de nucleótidos que abarca las posiciones 208 hasta 299 de la SEQ ID NO:11. Por medio de unas medidas técnicas para la prolongación de la duración de vida del ARNm (ARN mensajero) se mejora asimismo la expresión. Además, mediante evitación de la degradación de la proteína enzimática se puede reforzar asimismo la actividad enzimática. Alternativamente, se puede conseguir además una sobreexpresión del correspondiente gen o alelo mediante una modificación de la composición del medio y mediante una realización del cultivo.

Mediante las medidas técnicas de sobreexpresión se aumenta la actividad o concentración de la correspondiente proteína por lo general por lo menos en un 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 % o 500 %,

como máximo hasta en un 1.000 % o 2.000 %, referido a la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo de partida o respectivamente en la cepa parental. Por el concepto de "un microorganismo de partida" o de "una cepa parental" se entiende un microorganismo, en el que se llevan a cabo las medidas técnicas del invento.

Un método para la determinación de la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se describe en la cita de Moritz y colaboradores (European Journal of Biochemistry 267, 3442-3452 (2000)).

La concentración de la proteína se puede determinar en el gel por medio de una separación de proteínas en un gel uni- o bidimensional (de 1 y 2 dimensiones) y de una subsiguiente identificación óptica de la concentración de proteínas con un correspondiente software de evaluación. Un método habitual para la preparación de los geles para proteínas en el caso de bacterias corineformes y para la identificación de las proteínas lo constituye el modo de proceder descrito por Hermann y colaboradores (Electrophoresis, 22:1712-23 (2001)). La concentración de las proteínas se puede determinar asimismo mediante una hibridación por transferencia de bórón Western con un anticuerpo específico para la proteína que debe de ser detectada (Sambrook y colaboradores, Molecular cloning: a laboratory manual. 2ª edición Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989) y una subsiguiente evaluación óptica con un correspondiente software para la determinación de la concentración (Lohaus y Meyer (1998) Biospektrum 5:32-39; Lottspeich, Angewandte Chemie 321: 2630-2647 (1999)).

De modo correspondiente, son objeto del invento unos procedimientos para la sobreexpresión de las glucosa-6-fosfato deshidrogenasas conformes al invento. Un procedimiento conforme al invento para la sobreexpresión consiste, entre otras cosas, en que se aumenta el número de copias de un polinucleótido conforme al invento, que codifica una variante de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, en la que en la posición 321 o en la correspondiente posición de la secuencia de aminoácidos codificada está contenido cualquier aminoácido proteinógeno, con la excepción de la glicina, y en la que eventualmente en la posición 8 o en la posición correspondiente está contenido cualquier aminoácido proteinógeno, con la excepción de la L-serina, en por lo menos una (1) o varias copia(s). Otro procedimiento conforme al invento consiste en que se une un promotor funcional con un polinucleótido.

Son objeto del invento además unos microorganismos que tienen en el interior de sus células una concentración o una actividad aumentada de las variantes conformes al invento de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

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

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

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

- un gen *dapA*, que codifica la dihidrodipicolinato sintasa, tal como por ejemplo el gen *dpaA* del tipo silvestre de *Corynebacterium glutamicum*, descrito en el documento EP 0 197 335,
- un gen *zwf*, que codifica una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, tal como por ejemplo el gen *zwf* del tipo silvestre de *Corynebacterium glutamicum*, descrito en el documento de solicitud de patente japonesa JP-A-09224661 y en el de solicitud de patente europea EP-A-1108790,
- los alelos de *zwf* de *Corynebacterium glutamicum*, descritos en el documento US-2003-0175911-A1, que codifican una proteína, en la que, por ejemplo, la L-alanina en la posición 243 de la secuencia de aminoácidos ha sido reemplazada por L-treonina, o en la que el L-acido aspártico ha sido reemplazado en la posición 245 por L-serina,
- un gen *pyc*, que codifica una piruvato carboxilasa, tal como, por ejemplo, el gen *pyc* de tipo silvestre de *Corynebacterium glutamicum*, descrito en el documento de solicitud de patente alemana DE-A-198 31609 y en el documento EP 1108790,
- el alelo de *pyc* de *Corynebacterium glutamicum*, descrito en el documento EP 1 108 790, que codifica una proteína, en la que la L-prolina en la posición 458 de la secuencia de aminoácidos ha sido reemplazada por L-serina,
- el alelo de *pyc* de *Corynebacterium glutamicum*, descrito en el documento WO 02/31158, que codifica unas proteínas, que llevan de acuerdo con la reivindicación 1 uno o varios de los intercambios de aminoácidos, escogidos entre el conjunto que se compone de L-acido glutámico en la posición 153 reemplazado por L-

ácido aspártico, de L-alanina en la posición 182 reemplazada por L-serina, de L-alanina en la posición 206 reemplazada por L-serina, de L-histidina en la posición 227 reemplazada por L-arginina, de L-alanina en la posición 452 reemplazada por glicina y de L-ácido aspártico en la posición 1.120 reemplazado por L-ácido glutámico (la Figura 2A del documento WO 02/31158 indica dos diferentes posiciones de iniciación para la piruvato carboxilasa, que se diferencian en una longitud correspondiente a 17 aminoácidos. De modo correspondiente, la posición 153 de acuerdo con la reivindicación 1 del documento WO 02/31158 corresponde a la posición 170 de la Fig. 2A del documento 02/31158, la posición 182 de acuerdo con la reivindicación 1 corresponde a la posición 199 de la Fig. 2A, la posición 206 de acuerdo con la reivindicación 1 corresponde a la posición 223 de la Fig. 2A, la posición 227 de acuerdo con la reivindicación 1 corresponde a la posición 244 de la Fig. 2A, la posición 452 de acuerdo con la reivindicación 1 corresponde a la posición 469 de la Fig. 2A, la posición 1.120 de acuerdo con la reivindicación 1 corresponde a la posición 1.137 de la Fig. 2B. En la Figura 2A del documento WO 02/31158 se indica además un intercambio de aminoácidos de A (alanina) por G (glicina) en la posición 472. La posición 472 de la proteína con la secuencia MTA en el extremo terminal de N corresponde a la posición 455 de la proteína con la secuencia MST en el extremo terminal de N de acuerdo con la Fig. 2A. En la Fig. 2B del documento WO 02/31158 se indica además un intercambio de aminoácidos de D (ácido aspártico) por E (ácido glutámico) en la posición 1.133 de la proteína con la MTA en el extremo terminal de N),

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

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

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

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

Mediante las medidas técnicas del debilitamiento se reduce 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 el microorganismo de partida.

Como mutaciones para la producción de un debilitamiento entran en consideración transiciones, transversiones, inserciones y supresiones de por lo menos un (1) par de bases o respectivamente nucleótido. En dependencia del efecto del intercambio de aminoácidos, provocado por la mutación, sobre la actividad enzimática, se habla de mutaciones en un sentido erróneo (en inglés "missense mutations") o de mutaciones sin sentido (en inglés "non-sense mutations"). La mutación en un sentido erróneo conduce a un intercambio de un aminoácido dado en una proteína por otro distinto, tratándose en particular de un intercambio no conservativo de aminoácidos. De esta

manera, se perjudica la capacidad de funcionar o respectivamente la actividad de la proteína y se reduce a un valor de 0 a 75 %, de 0 a 50 %, de 0 a 25 %, de 0 a 10 % o de 0 a 5 %. La mutación sin sentido da lugar a un codón de interrupción en la región codificadora del gen, y, por consiguiente, a una interrupción prematura de la traducción. Las inserciones o supresiones de por lo menos un par de bases en un gen dan lugar a unas mutaciones por desplazamiento del marco de lectura (en inglés "frame shift mutations"), que dan lugar a que sean incorporados unos aminoácidos erróneos, o a que la traducción se interrumpa prematuramente. Si como consecuencia de la mutación resulta un codón de interrupción en la región codificadora, entonces esto da lugar asimismo a una interrupción prematura de la traducción.

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

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

Por el concepto de "bacterias aisladas" se han de entender los mutantes y las bacterias recombinantes aislados/as o respectivamente producidos/as conformes al invento, que contienen un alelo de zwf, que codifica una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que contiene el intercambio de aminoácidos descrito en la posición 321 de la secuencia de aminoácidos y eventualmente un intercambio de aminoácidos de L-serina por otro aminoácido proteínogeno, de manera preferida L-treonina, en la posición 8.

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

Las bacterias corineformes aisladas, conformes al invento, se pueden cultivar continuamente - tal como se ha descrito por ejemplo en el documento PCT/EP2004/008882 - o discontinuamente en el procedimiento batch (cultivación por tandas) o en el procedimiento fed batch (procedimiento de afluencia) o en el procedimiento fed batch repeated (procedimiento de afluencia repetida) con el fin de efectuar la producción de L-aminoácidos. Una recopilación 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 el 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 o respectivamente de un medio se pueden intercambiar recíprocamente.

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

Como fuente de nitrógeno se pueden utilizar compuestos orgánicos que contienen nitrógeno, tales como peptonas, un extracto de levadura, un extracto de carne, un extracto de malta, agua de maceración de maíz, harina de soja y urea, o compuestos inorgánicos, tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Las fuentes de nitrógeno se pueden utilizar individualmente o como una mezcla.

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

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

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

Para realizar el control del pH del cultivo se emplean de un modo apropiado compuestos de carácter básico, tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco o respectivamente agua amoniacal, o compuestos de carácter ácido, tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. El pH se ajusta en general a un valor de 6,0 hasta 9,0, de manera preferida de 6,5 hasta 8. Para la represión del desarrollo de espuma se pueden emplear agentes antiespumantes, tales como por ejemplo ésteres poliglicólicos de ácidos grasos. Para la conservación de la estabilidad de los plásmidos, se pueden añadir al medio unas apropiadas sustancias que actúan de un modo selectivo, por ejemplo antibióticos. Con el fin de mantener unas condiciones aerobias, se introducen en el cultivo oxígeno o mezclas gaseosas que contienen oxígeno, tales como por ejemplo aire. La utilización de unos líquidos, que están enriquecidos con peróxido de hidrógeno, es asimismo posible. Eventualmente, la fermentación se realiza a sobrepresión, por ejemplo a una presión de 0,03 a 0,2 MPa. La temperatura del cultivo está situada normalmente en 20°C hasta 45°C y de manera preferida en 25°C

a) se fermenta una bacteria corineforme aislada en un medio adecuado, conteniendo la bacteria por lo menos una copia de un gen que codifica un polipéptido con la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, escogiéndose las secuencias de aminoácidos del polipéptido entre el conjunto que se compone de

- la SEQ ID NO:2 en la que en la posición 321 está contenida la L-serina
- la SEQ ID NO:2 en la que en la posición 321 está contenida la L-serina y en la que el aminoácido L-serina es reemplazado en la posición 8 por otro aminoácido proteinógeno
- la SEQ ID NO:6
- la SEQ ID NO:8
- la SEQ ID NO:10
- la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:10 inclusive una o como máximo 5 inserción/inserciones o supresión/supresiones de aminoácidos, diferenciándose la actividad enzimática como máximo en un 5 % de la actividad del polipéptido con respecto de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6, 8 o 10

b) se enriquece el L-aminoácido en el caldo de fermentación o en las células de la bacteria corineforme aislada.

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

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

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

A los productos secundarios orgánicos pertenecen unas sustancias, que son producidas por los microorganismos empleados al realizar la fermentación del respectivo L-aminoácido deseado y que son segregadas eventualmente. Entre éstos/as se cuentan unos L-aminoácidos, que en comparación con el aminoácido deseado constituyen menos

que un 30 %, 20 % o 10 %. A éstos pertenecen además unos ácidos orgánicos, que llevan de uno a tres grupos carboxilo, tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico, ácido málico o ácido fumárico. Finalmente, a éstos pertenecen también unos azúcares tales como, por ejemplo, trehalosa.

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

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

15 Un conjunto de productos que contienen L-lisina abarca unas soluciones concentradas, acuosas, de carácter alcalino, de L-lisina purificada (documento de patente europea EP-B-0534865). Otro conjunto, tal como el descrito por ejemplo en los documentos US 6.340.486 y US 6.465.025, abarca unos concentrados acuosos, de carácter ácido, que contienen una biomasa, de caldos de fermentación que contienen L-lisina. El conjunto más conocido de productos sólidos abarca unas formas pulverulentas o cristalinas de L-lisina purificada o respectivamente pura, que se presenta típicamente en forma de una sal tal como, por ejemplo, el monohidrócloruro de L-lisina. Otro conjunto de formas de productos sólidos 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 de partida empleadas, que se han utilizado durante la producción por fermentación y que no se han consumido, y eventualmente la biomasa del microorganismo empleado con una proporción de > 0 % - 100 %.

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

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

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

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

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

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

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

65

Finalmente, el caldo de fermentación obtenido después de la fermentación, se puede ajustar a un valor ácido del pH, antes o después de la eliminación total o parcial de la biomasa, con un ácido inorgánico tal como, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico, o con un ácido orgánico, tal como, por ejemplo, ácido propiónico (documento de patente británica GB 1.439.728 o documento EP 1 331 220). De igual manera es posible acidificar el

5 caldo de fermentación con la biomasa contenida completamente (documentos US 6.340.486 o US 6.465.025). Finalmente, el caldo se puede estabilizar también mediante una adición de bisulfito de sodio (NaHSO_3 , documento de patente británica GB 1.439.728) o de otra sal, tal como, por ejemplo, una sal de amonio, de un metal alcalino o de un metal alcalino-térreo del ácido sulfuroso.

10 Al realizar la separación de la biomasa, se eliminan parcial o totalmente los materiales sólidos orgánicos o inorgánicos contenidos eventualmente en el caldo de fermentación. Los productos secundarios orgánicos, que están disueltos en el caldo de fermentación, y los componentes disueltos, que no se han consumido, del medio de fermentación (es decir, las sustancias 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 %

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

20 A continuación, al caldo se le substraen el agua con métodos conocidos, tales como p.ej. con ayuda de un evaporador rotatorio, un evaporador de capa fina, un evaporador de película descendente, mediante una ósmosis inversa o mediante una nanofiltración, o respectivamente él es espesado o concentrado. Este caldo de fermentación aumentado de concentración se puede elaborar seguidamente mediante métodos de la liofilización, la desecación por atomización, la granulación por atomización o mediante procedimientos de otros tipos, tal como, por ejemplo, en

25 una capa fluidizada circulante, tal como se ha descrito en el documento PCT/EP2004/006655, para dar unos productos capaces de corrimiento, en particular para dar un polvo finamente dividido o de manera preferida un granulado de granos gruesos. Eventualmente, el producto deseado se puede aislar a partir del granulado obtenido mediante tamizado o separación del polvo.

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

Por el concepto de "capaz de corrimiento" se entienden unos polvos que salen sin obstáculos desde una serie de recipientes de salida de vidrio, que tienen unos orificios de salida de diferentes tamaños, y por lo menos desde el

35 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 unos diámetros de 20 a 200 μm .

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

La determinación de los tamaños de los granos se puede llevar a cabo con los métodos de la espectrometría por

45 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)).

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

El concepto de "exento de polvo" significa, que el producto contiene solamente unas pequeñas proporciones (< 5%)

55 de unos tamaños de granos con diámetros por debajo de 100 μm .

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

60 pérdida esencial (< 5 %) del respectivo aminoácido.

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

a) cultivación y fermentación de una bacteria corineforme que segrega un L-aminoácido, que contiene por lo menos un alelo de zwf, que codifica un polipéptido con la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, en la que en la posición 321 o en la posición comparable está contenido cualquier aminoácido proteinógeno exceptuando la glicina, de manera preferida L-serina, y estando contenido eventualmente en la posición 8 o en la posición comparable cualquier aminoácido proteinógeno exceptuando la L-serina, de manera preferida L-treonina, en un medio de fermentación,

b) eliminación de la biomasa formada durante la fermentación, en una proporción de 0 a 100 % en peso, y

c) desecación del caldo de fermentación obtenido de acuerdo con a) y/o b), con el fin de obtener el producto en la deseada forma de polvo o granulado,

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

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

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

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

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

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

Para el ajuste de una concentración deseada de aminoácidos en el producto, según sea el requisito, el respectivo aminoácido 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. Éstos/as se pueden añadir individualmente o como unas mezclas al caldo de fermentación, o también durante el proceso de desecación o granulación.

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

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

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

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

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

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

La descripción divulga también un aditivo para piensos, que contiene L-lisina, constituido sobre la base de un caldo de fermentación, que tiene las siguientes características

a) un contenido de lisina (como la base de lisina) de desde por lo menos 10 % en peso hasta como máximo 73 % en peso,

b) un contenido de agua de a lo sumo 5 % en peso y

c) un contenido de biomasa correspondiente a por lo menos un 0,1 % de la biomasa contenida en el caldo de fermentación, formándose la biomasa eventualmente desactivada a partir de las bacterias corineformes conformes al invento.

La descripción divulga también un aditivo para piensos, que contiene L-triptófano, constituido sobre la base de un caldo de fermentación, que tiene las siguientes características

a) un contenido de triptófano de desde por lo menos 5 % en peso hasta como máximo 95 % en peso,

b) un contenido de agua de a lo sumo 5 % en peso y

c) un contenido de biomasa correspondiente a por lo menos un 0,1 % de la biomasa contenida en el caldo de fermentación, formándose la biomasa eventualmente desactivada a partir de las bacterias corineformes conformes al invento.

Un mutante de *Corynebacterium glutamicum* con la denominación DM1797, que contiene el intercambio de aminoácidos lysC T311I en la aspartato cinasa, fue depositado el 28 de octubre de 2004 en la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Alemania) como DSM 16833.

El mutante de *Corynebacterium glutamicum* DM1816 conforme al invento, que contiene L-serina en la posición 321 de la secuencia de aminoácidos del polipéptido Zwf, se depositó el 09 de febrero de 2005 en la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Alemania) como DSM 17119.

El mutante *Corynebacterium glutamicum* DM1889 conforme al invento, que contiene L-serina en la posición 321 de la secuencia de aminoácidos del polipéptido Zwf, se depositó el 16 de marzo de 2006 en la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Alemania) como DSM 18062.

Ejemplo 1

Mutagénesis de la cepa DM1797 que produce L-lisina

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

La cepa DM1797 se cultivó en 10 ml del caldo LB-Bouillon (de Merck, Darmstadt, Alemania), que estaban contenidos en un matraz Erlenmeyer con una capacidad de 100 ml, durante 24 horas, a 33°C y 200 rpm (revoluciones por minuto), en un aparato sacudidor rotatorio del tipo Certomat BS-1 (B. Braun Biotech International, Melsungen, Alemania). A continuación, el cultivo se separó por centrifugación, el sedimento se volvió a suspender en 10 ml de una solución al 0,9 % de NaCl, la suspensión obtenida se separó otra vez por centrifugación y el sedimento obtenido se recogió en 10 ml de una solución al 0,9 % de NaCl. 5 ml de esta suspensión de células se trataron con 400 µg/ml de MNNG durante 15 minutos a 30°C y 200 rpm en un aparato sacudidor (véase más arriba). A continuación, la tanda de mutagénesis se separó por centrifugación y el sedimento se recogió en 10 ml de

tiosulfato de Na al 2 % en un tampón de NaCl al 0,9 % (pH = 6,0). La suspensión de células se diluyó a continuación en las relaciones de 1:1.000, 1:10.000 y 1:100.000 con una solución al 0,9 % de NaCl, y unos partes alícuotas se sembraron en placas sobre un agar de corazón y cerebro (de Merck, Darmstadt, Alemania). De esta manera se aislaron aproximadamente 2.500 mutantes.

Ejemplo 2

Ensayo de rendimiento de los mutantes de la cepa DM1797

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

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

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

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

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 %.

Después de 24 horas se determinó la densidad óptica (DO) en el caso de una longitud de onda de medición de 660 nm con el Biomek 1000 (de Beckmann Instruments GmbH, Munich). La cantidad de lisina formada se determinó con un analizador de aminoácidos Bio Tronik de la entidad Eppendorf (Hamburgo, Alemania) mediante una cromatografía con intercambio de iones y una derivatización posterior en la columna con detección por ninhidrina. Un mutante, que se distinguía por una formación aumentada de lisina, se designó como DM1816.

Tabla 1

Cepa	DO (660)	Lisina-HCl (g/l)
DM1797	11,7	3,6
DM1816	11,8	3,9

Ejemplo 3

Secuenciación del gen zwf del mutante DM1816

A partir del clon DM1816, con el método de Eikmanns y colaboradores (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) se aisló un ADN cromosomal. Con ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa se amplificó un fragmento de ADN, que lleva el gen zwf. Para esto se utilizaron los siguientes oligonucleótidos como cebadores.

zwf-L1 (SEQ ID NO: 19):

5' agaagctgac gctgtgtct 3'

zwf-L2 (SEQ ID NO: 20):

5' cattggtgga ctcgtaact 3'

Los cebadores expuestos fueron sintetizados por la entidad MWG Biotech (Ebersberg, Alemania). Ellos hacen posible la amplificación de un fragmento de ADN con una longitud de aproximadamente 1,95 kb (kilobases), que lleva el gen *zwf*. El cebador *zwf*-L1 se fija a la región que corresponde a las posiciones 59 hasta 78 de la cadena complementaria con respecto a la SEQ ID NO: 3. El cebador *zwf*-L2 se fija a la región que corresponde a las posiciones 2.026 hasta 2.007 de la cadena de acuerdo con la SEQ ID NO: 3.

La reacción de PCR se llevó a cabo con la polimerasa de ADN Phusion High Fidelity (de New England Biolabs, Francfort, Alemania). La tanda de reacción se formuló según los datos del fabricante y contenía, 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, unos cebadores en una concentración de 0,5 µM, aproximadamente 50 ng de ADN de molde y 2 unidades de la polimerasa Phusion. Mediante adición de H₂O se ajustó el volumen a 50 µl.

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

La secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN amplificado o respectivamente del producto de la PCR fue determinada por la entidad Agowa (Berlín, Alemania). La secuencia obtenida de la región codificadora del alelo de *zwf* se representa en la SEQ ID NO: 9. La secuencia de aminoácidos, que se establece con ayuda del programa Patentin, se representa en la SEQ ID NO: 10.

La secuencia de nucleótidos de la región codificadora del alelo de *zwf* del mutante DM1816 contiene en la posición 961 la nucleobase adenina (véase la SEQ ID NO: 5 o 9). El gen del tipo silvestre (véase la SEQ ID NO: 1) contiene en esta posición la nucleobase guanina. Esta transición de guanina a adenina conduce a un intercambio de aminoácidos de glicina por serina en la posición 321 de la secuencia de aminoácidos resultante. Esta mutación se designa a continuación como *zwf*G321S. Además el alelo de *zwf* de DM1816 contiene todavía el intercambio de nucleótidos de timina por adenina en la posición 22 de la secuencia de nucleótidos. Esta transversión de timina a adenina conduce a un intercambio de aminoácidos de serina por treonina en la posición 8 de la resultante secuencia de aminoácidos.

Además, el alelo de *zwf* de DM1816 contiene todavía otros cinco intercambios adicionales de nucleótidos, que no conducen a ningún intercambio de aminoácidos ("mutaciones mudas"): una transición de citosina a timina en la posición 138, una transición de citosina a timina en la posición 279, una transición de timina a citosina en la posición 738, una transición de citosina a timina en la posición 777 y una transición de guanina a adenina en la posición 906.

Ejemplo 4

Construcción del vector de intercambio pk18mobsacB_opcAaa4ex

Con ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa se amplificó una parte de la región codificadora, es decir un denominado fragmento interno o respectivamente una denominada región interna, del alelo de *zwf*, que contiene la mutación *zwf*G321S. Como molde se utilizó el ADN cromosomal obtenido en el Ejemplo 3. Se escogieron los siguientes oligonucleótidos como cebadores para la PCR.

zwf-int1-bam (SEQ ID NO: 23):

5' ctag-ggatcc-acgtacgcgatccgcaagt 3'

zwf-int2-bam (SEQ ID NO: 24):

5' ctag-ggatcc-tcaggctgcacgcaatcac 3'

Ellos fueron sintetizados por la entidad MWG Biotech (Ebersberg, Alemania) y hacen posible la amplificación de un segmento de ADN de la región codificadora con una longitud de aproximadamente 1 kb. Los nucleótidos 11 hasta 30 del cebador *zwf*-int 1bam se fijan a la región correspondiente a las posiciones 546 hasta 565 de la cadena complementaria con respecto a la SEQ ID NO: 3. Las posiciones 546 y 565 de la SEQ ID NO:3 corresponden a las posiciones 239 y 258 en la SEQ ID NO:1. Los nucleótidos 11 hasta 30 del cebador *zwf*-int2-bam se fijan a la región correspondiente a las posiciones 1.527 hasta 1.508 de la cadena de acuerdo con la SEQ ID NO: 3. Las posiciones 1.527 y 1.508 de la SEQ ID NO:3 corresponden a las posiciones 1.220 y 1.201 de la SEQ ID NO:1. Además, los

cebadores contienen las secuencias para los sitios de corte por la endonucleasa de restricción BamHI, que se han marcado mediante subrayado en la secuencias de nucleótidos arriba representadas.

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 más arriba descrita. La PCR se llevó a cabo tal como se ha descrito arriba con una excepción: la etapa de extensión a 72°C en la repetición de 35 veces se llevó a cabo en cada caso sólo durante 30 segundos.

El material amplificado con una longitud de aproximadamente 1 kb se trató con la endonucleasa de restricción BamHI y se identificó mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%. A continuación, él se aisló a partir del gel y se purificó con el estuche QIAquick Gel Extraction Kit de la entidad Qiagen.

El fragmento de ADN purificado de esta manera contiene la mutación zwfG321S descrita y posee unos extremos compatibles con BamHI (fragmento zwfG321S o respectivamente "zwf" en la Figura 1). A continuación, él fue incorporado en el vector pK18mobsacB movilizable, descrito por Schäfer y colaboradores (Gene 145, 69-73 (1994), con el fin de hacer posible un intercambio de alelos o respectivamente de mutaciones. Para esto, el pK18mobsacB fue digerido con la enzima de restricción BamHI y los extremos fueron desfosforilados con una fosfatasa alcalina (Alkaline Phosphatase, de Boehringer Mannheim, Alemania). El vector preparado previamente de esta manera se mezcló con el fragmento zwfG321S 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, 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 y fue comprobado mediante una disociación por restricción, en cada caso una vez con la enzima BamHI y una vez con la enzima SacI, y mediante una subsiguiente electroforesis en gel de agarosa. El plásmido fue denominado pK18mobsacB_zwfG321S y se ha representado en la Figura 1.

Ejemplo 5

Incorporación de la mutación zwfG321S en la cepa DM1797

El vector pK18mobsacB_zwfG321S descrito en el Ejemplo 4 fue transferido por conjugación a la cepa DM1797 de C. glutamicum de acuerdo con el protocolo de Schäfer y colaboradores (Journal of Microbiology 172: 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 transconjugantes, es decir de clones con el pK18mobsacB_zwfG321S 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 frente a kanamicina fueron extendidos como un frote a continuación sobre placas de agar LB suplementadas con kanamicina (25 mg/l), y se incubaron durante 24 horas a 33°C. Para realizar la selección de mutantes, en los que, 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_zwfG321S, al igual que el plásmido de partida pK18mobsacB, junto al gen de resistencia a kanamicina, contiene una copia del gen sacB que codifica la levano sucraza procedente de Bacillus subtilis. La expresión del gen sacB, 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_zwfG321S integrado se ha escindido como consecuencia de un segundo suceso de recombinación. En dependencia de la localización del segundo suceso de recombinación en lo que respecta al sitio de la mutación tiene lugar una escisión del intercambio de alelos o respectivamente de 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 zwfG321S. 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 zwf. De esta manera se identificó un clon, que lleva la mutación zwfG321S. Esta cepa fue designada como C. glutamicum DM1797_zwfG321S.

Ejemplo 6

Comparación del rendimiento de la cepa DM1797_zwfG321S con la cepa de partida DM1797.

- 5 El ensayo de rendimiento se llevó a cabo tal como se ha descrito en el Ejemplo 2. La cepa DM1797_zwfG321S mostró, en comparación con la cepa DM1797, una segregación aumentada de lisina, similar a la de la DM1816 (véase la Tabla 1).

LISTA DE SECUENCIAS:

- 5 <110> Degussa AG
- <120> Alelos del gen zwf de bacterias corineformes
- <130> 050009BT
- 10 <160> 24
- <170> PatentIn version 3.3
- 15 <210> 1
- <211> 1545
- <212> ADN
- <213> Corynebacterium glutamicum
- 20 <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(1542)
- <223> gen zwf de tipo silvestre
- <400> 1

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

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

cag cct ttc gac ggc gac atg act gta tcc ctt ggc caa aac gcc atc	1200
Gln Pro Phe Asp Gly Asp Met Thr Val Ser Leu Gly Gln Asn Ala Ile	
385 390 395 400	
gtg att cgc gtg cag cct gat gaa ggt gtg ctc atc cgc ttc ggt tcc	1248
Val Ile Arg Val Gln Pro Asp Glu Gly Val Leu Ile Arg Phe Gly Ser	
405 410 415	
aag gtt cca ggt tct gcc atg gaa gtc cgt gac gtc aac atg gac ttc	1296
Lys Val Pro Gly Ser Ala Met Glu Val Arg Asp Val Asn Met Asp Phe	
420 425 430	
tcc tac tca gaa tcc ttc act gaa gaa tca cct gaa gca tac gag cgc	1344
Ser Tyr Ser Glu Ser Phe Thr Glu Glu Ser Pro Glu Ala Tyr Glu Arg	
435 440 445	
ctc att ttg gat gcg ctg tta gat gaa tcc agc ctc ttc cct acc aac	1392
Leu Ile Leu Asp Ala Leu Leu Asp Glu Ser Ser Leu Phe Pro Thr Asn	
450 455 460	
gag gaa gtg gaa ctg agc tgg aag att ctg gat cca att ctt gaa gca	1440
Glu Glu Val Glu Leu Ser Trp Lys Ile Leu Asp Pro Ile Leu Glu Ala	
465 470 475 480	
tgg gat gcc gat gga gaa cca gag gat tac cca gcg ggt acg tgg ggt	1488
Trp Asp Ala Asp Gly Glu Pro Glu Asp Tyr Pro Ala Gly Thr Trp Gly	
485 490 495	
cca aag agc gct gat gaa atg ctt tcc cgc aac ggt cac acc tgg cgc	1536
Pro Lys Ser Ala Asp Glu Met Leu Ser Arg Asn Gly His Thr Trp Arg	
500 505 510	
agg cca taa	1545
Arg Pro	

<210> 2

<211> 514

5 <212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 2

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

Val Arg Asp Ala Ala Ser Ala Gly Ala Arg Thr Glu Phe Arg Glu Asn
85 90 95

Val Trp Glu Arg Leu Ala Glu Gly Met Glu Phe Val Arg Gly Asn Phe
100 105 110

Asp Asp Asp Ala Ala Phe Asp Asn Leu Ala Ala Thr Leu Lys Arg Ile
115 120 125

Asp Lys Thr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Trp Ala Tyr Tyr Leu Ser Ile
130 135 140

Pro Pro Asp Ser Phe Thr Ala Val Cys His Gln Leu Glu Arg Ser Gly
145 150 155 160

Met Ala Glu Ser Thr Glu Glu Ala Trp Arg Arg Val Ile Ile Glu Lys
165 170 175

Pro Phe Gly His Asn Leu Glu Ser Ala His Glu Leu Asn Gln Leu Val
180 185 190

Asn Ala Val Phe Pro Glu Ser Ser Val Phe Arg Ile Asp His Tyr Leu
195 200 205

Gly Lys Glu Thr Val Gln Asn Ile Leu Ala Leu Arg Phe Ala Asn Gln
210 215 220

Leu Phe Glu Pro Leu Trp Asn Ser Asn Tyr Val Asp His Val Gln Ile
225 230 235 240

Thr Met Ala Glu Asp Ile Gly Leu Gly Gly Arg Ala Gly Tyr Tyr Asp
245 250 255

Gly Ile Gly Ala Ala Arg Asp Val Ile Gln Asn His Leu Ile Gln Leu
260 265 270

Leu Ala Leu Val Ala Met Glu Glu Pro Ile Ser Phe Val Pro Ala Gln
275 280 285

Leu Gln Ala Glu Lys Ile Lys Val Leu Ser Ala Thr Lys Pro Cys Tyr
290 295 300

Pro Leu Asp Lys Thr Ser Ala Arg Gly Gln Tyr Ala Ala Gly Trp Gln
305 310 315 320

Gly Ser Glu Leu Val Lys Gly Leu Arg Glu Glu Asp Gly Phe Asn Pro
325 330 335

Glu Ser Thr Thr Glu Thr Phe Ala Ala Cys Thr Leu Glu Ile Thr Ser
340 345 350

Arg Arg Trp Ala Gly Val Pro Phe Tyr Leu Arg Thr Gly Lys Arg Leu
355 360 365

Gly Arg Arg Val Thr Glu Ile Ala Val Val Phe Lys Asp Ala Pro His
370 375 380

Gln Pro Phe Asp Gly Asp Met Thr Val Ser Leu Gly Gln Asn Ala Ile
385 390 395 400

Val Ile Arg Val Gln Pro Asp Glu Gly Val Leu Ile Arg Phe Gly Ser
405 410 415

Lys Val Pro Gly Ser Ala Met Glu Val Arg Asp Val Asn Met Asp Phe
420 425 430

Ser Tyr Ser Glu Ser Phe Thr Glu Glu Ser Pro Glu Ala Tyr Glu Arg
435 440 445

Leu Ile Leu Asp Ala Leu Leu Asp Glu Ser Ser Leu Phe Pro Thr Asn
450 455 460

Glu Glu Val Glu Leu Ser Trp Lys Ile Leu Asp Pro Ile Leu Glu Ala
465 470 475 480

Trp Asp Ala Asp Gly Glu Pro Glu Asp Tyr Pro Ala Gly Thr Trp Gly
485 490 495

Pro Lys Ser Ala Asp Glu Met Leu Ser Arg Asn Gly His Thr Trp Arg
500 505 510

Arg Pro

<210> 3
<211> 2100
5 <212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<221> CDS
10 <222> (308)..(1849)
<223> gen zwf de tipo silvestre

<400> 3

tcgacgcgggt tctggagcag ggcaacctgc acggtgacac cctgtccaac tccgcggcag	60
aagctgacgc tgtgttctcc cagcttgagg ctctgggcgt tgacttggca gatgtcttcc	120
aggtcctgga gaccgaggggt gtggacaagt tcgttgcttc ttggagcgaa ctgcttgagt	180
ccatggaagc tcgcctgaag tagaatcagc acgctgcac agtaacggcg acatgaaatc	240
gaattagttc gatcttatgt ggccgttaca catctttcat taaagaaagg atcgtgacac	300
taccatc gtg agc aca aac acg acc ccc tcc agc tgg aca aac cca ctg	349
Val Ser Thr Asn Thr Thr Pro Ser Ser Trp Thr Asn Pro Leu	
1 5 10	
cgc gac ccg cag gat aaa cga ctc ccc cgc atc gct ggc cct tcc ggc	397
Arg Asp Pro Gln Asp Lys Arg Leu Pro Arg Ile Ala Gly Pro Ser Gly	
15 20 25 30	
atg gtg atc ttc ggt gtc act ggc gac ttg gct cga aag aag ctg ctc	445
Met Val Ile Phe Gly Val Thr Gly Asp Leu Ala Arg Lys Lys Leu Leu	
35 40 45	
ccc gcc att tat gat cta gca aac cgc gga ttg ctg ccc cca gga ttc	493
Pro Ala Ile Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Gly Leu Leu Pro Pro Gly Phe	
50 55 60	
tcg ttg gta ggt tac ggc cgc cgc gaa tgg tcc aaa gaa gac ttt gaa	541
Ser Leu Val Gly Tyr Gly Arg Arg Glu Trp Ser Lys Glu Asp Phe Glu	
65 70 75	
aaa tac gta cgc gat gcc gca agt gct ggt gct cgt acg gaa ttc cgt	589
Lys Tyr Val Arg Asp Ala Ala Ser Ala Gly Ala Arg Thr Glu Phe Arg	
80 85 90	
gaa aat gtt tgg gag cgc ctc gcc gag ggt atg gaa ttt gtt cgc ggc	637
Glu Asn Val Trp Glu Arg Leu Ala Glu Gly Met Glu Phe Val Arg Gly	
95 100 105 110	
aac ttt gat gat gat gca gct ttc gac aac ctc gct gca aca ctc aag	685
Asn Phe Asp Asp Asp Ala Ala Phe Asp Asn Leu Ala Ala Thr Leu Lys	
115 120 125	
cgc atc gac aaa acc cgc ggc acc gcc ggc aac tgg gct tac tac ctg	733
Arg Ile Asp Lys Thr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Trp Ala Tyr Tyr Leu	
130 135 140	
tcc att cca cca gat tcc ttc aca gcg gtc tgc cac cag ctg gag cgt	781
Ser Ile Pro Pro Asp Ser Phe Thr Ala Val Cys His Gln Leu Glu Arg	
145 150 155	
tcc ggc atg gct gaa tcc acc gaa gaa gca tgg cgc cgc gtg atc atc	829
Ser Gly Met Ala Glu Ser Thr Glu Glu Ala Trp Arg Arg Val Ile Ile	
160 165 170	
gag aag cct ttc ggc cac aac ctc gaa tcc gca cac gag ctc aac cag	877
Glu Lys Pro Phe Gly His Asn Leu Glu Ser Ala His Glu Leu Asn Gln	
175 180 185 190	

ctg gtc aac gca gtc ttc cca gaa tct tct gtg ttc cgc atc gac cac Leu Val Asn Ala Val Phe Pro Glu Ser Ser Val Phe Arg Ile Asp His 195 200 205	925
tat ttg ggc aag gaa aca gtt caa aac atc ctg gct ctg cgt ttt gct Tyr Leu Gly Lys Glu Thr Val Gln Asn Ile Leu Ala Leu Arg Phe Ala 210 215 220	973
aac cag ctg ttt gag cca ctg tgg aac tcc aac tac gtt gac cac gtc Asn Gln Leu Phe Glu Pro Leu Trp Asn Ser Asn Tyr Val Asp His Val 225 230 235	1021
cag atc acc atg gct gaa gat att ggc ttg ggt gga cgt gct ggt tac Gln Ile Thr Met Ala Glu Asp Ile Gly Leu Gly Gly Arg Ala Gly Tyr 240 245 250	1069
tac gac ggc atc ggc gca gcc cgc gac gtc atc cag aac cac ctg atc Tyr Asp Gly Ile Gly Ala Ala Arg Asp Val Ile Gln Asn His Leu Ile 255 260 265 270	1117
cag ctc ttg gct ctg gtt gcc atg gaa gaa cca att tct ttc gtg cca Gln Leu Leu Ala Leu Val Ala Met Glu Glu Pro Ile Ser Phe Val Pro 275 280 285	1165
gcg cag ctg cag gca gaa aag atc aag gtg ctc tct gcg aca aag ccg Ala Gln Leu Gln Ala Glu Lys Ile Lys Val Leu Ser Ala Thr Lys Pro 290 295 300	1213
tgc tac cca ttg gat aaa acc tcc gct cgt ggt cag tac gct gcc ggt Cys Tyr Pro Leu Asp Lys Thr Ser Ala Arg Gly Gln Tyr Ala Ala Gly 305 310 315	1261
tgg cag ggc tct gag tta gtc aag gga ctt cgc gaa gaa gat ggc ttc Trp Gln Gly Ser Glu Leu Val Lys Gly Leu Arg Glu Glu Asp Gly Phe 320 325 330	1309
aac cct gag tcc acc act gag act ttt gcg gct tgt acc tta gag atc Asn Pro Glu Ser Thr Thr Glu Thr Phe Ala Ala Cys Thr Leu Glu Ile 335 340 345 350	1357
acg tct cgt cgc tgg gct ggt gtg ccg ttc tac ctg cgc acc ggt aag Thr Ser Arg Arg Trp Ala Gly Val Pro Phe Tyr Leu Arg Thr Gly Lys 355 360 365	1405
cgt ctt ggt cgc cgt gtt act gag att gcc gtg gtg ttt aaa gac gca Arg Leu Gly Arg Arg Val Thr Glu Ile Ala Val Val Phe Lys Asp Ala 370 375 380	1453
cca cac cag cct ttc gac ggc gac atg act gta tcc ctt ggc caa aac Pro His Gln Pro Phe Asp Gly Asp Met Thr Val Ser Leu Gly Gln Asn 385 390 395	1501
gcc atc gtg att cgc gtg cag cct gat gaa ggt gtg ctc atc cgc ttc Ala Ile Val Ile Arg Val Gln Pro Asp Glu Gly Val Leu Ile Arg Phe 400 405 410	1549
ggt tcc aag gtt cca ggt tct gcc atg gaa gtc cgt gac gtc aac atg Gly Ser Lys Val Pro Gly Ser Ala Met Glu Val Arg Asp Val Asn Met 415 420 425 430	1597

gac ttc tcc tac tca gaa tcc ttc act gaa gaa tca cct gaa gca tac 1645
 Asp Phe Ser Tyr Ser Glu Ser Phe Thr Glu Glu Ser Pro Glu Ala Tyr
 435 440 445

gag cgc ctc att ttg gat gcg ctg tta gat gaa tcc agc ctc ttc cct 1693
 Glu Arg Leu Ile Leu Asp Ala Leu Leu Asp Glu Ser Ser Leu Phe Pro
 450 455 460

acc aac gag gaa gtg gaa ctg agc tgg aag att ctg gat cca att ctt 1741
 Thr Asn Glu Glu Val Glu Leu Ser Trp Lys Ile Leu Asp Pro Ile Leu
 465 470 475

gaa gca tgg gat gcc gat gga gaa cca gag gat tac cca gcg ggt acg 1789
 Glu Ala Trp Asp Ala Asp Gly Glu Pro Glu Asp Tyr Pro Ala Gly Thr
 480 485 490

tgg ggt cca aag agc gct gat gaa atg ctt tcc cgc aac ggt cac acc 1837
 Trp Gly Pro Lys Ser Ala Asp Glu Met Leu Ser Arg Asn Gly His Thr
 495 500 505 510

tgg cgc agg cca taatttaggg gcaaaaaatg atctttgaac ttcgggatac 1889
 Trp Arg Arg Pro

caccaccag caaatttcca agaccctaac tcgactgcgt gaatcgggca cccaggtcac 1949

caccggccga gtgctcacc tcacgttggt cactgactcc gaaagcgatg tcgctgcagt 2009

taccgagtcc accaatgaag cctcgcgcca gcacccatct cgcgtgatca ttttggtggt 2069

tggcgataaaa actgcagaaa acaaagttga c 2100

<210> 4

<211> 514

<212> PRT

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 4

Val Ser Thr Asn Thr Thr Pro Ser Ser Trp Thr Asn Pro Leu Arg Asp
 1 5 10 15

Pro Gln Asp Lys Arg Leu Pro Arg Ile Ala Gly Pro Ser Gly Met Val
 20 25 30

Ile Phe Gly Val Thr Gly Asp Leu Ala Arg Lys Lys Leu Leu Pro Ala
 35 40 45

Ile Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Gly Leu Leu Pro Pro Gly Phe Ser Leu
 50 55 60

Val Gly Tyr Gly Arg Arg Glu Trp Ser Lys Glu Asp Phe Glu Lys Tyr
 65 70 75 80

Val Arg Asp Ala Ala Ser Ala Gly Ala Arg Thr Glu Phe Arg Glu Asn
 85 90 95

Val Trp Glu Arg Leu Ala Glu Gly Met Glu Phe Val Arg Gly Asn Phe
 100 105 110

Asp Asp Asp Ala Ala Phe Asp Asn Leu Ala Ala Thr Leu Lys Arg Ile
 115 120 125

Asp Lys Thr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Trp Ala Tyr Tyr Leu Ser Ile
 130 135 140

Pro Pro Asp Ser Phe Thr Ala Val Cys His Gln Leu Glu Arg Ser Gly
 145 150 155 160

Met Ala Glu Ser Thr Glu Glu Ala Trp Arg Arg Val Ile Ile Glu Lys
 165 170 175

Pro Phe Gly His Asn Leu Glu Ser Ala His Glu Leu Asn Gln Leu Val
 180 185 190

Asn Ala Val Phe Pro Glu Ser Ser Val Phe Arg Ile Asp His Tyr Leu
 195 200 205

Gly Lys Glu Thr Val Gln Asn Ile Leu Ala Leu Arg Phe Ala Asn Gln
 210 215 220

Leu Phe Glu Pro Leu Trp Asn Ser Asn Tyr Val Asp His Val Gln Ile
 225 230 235 240

Thr Met Ala Glu Asp Ile Gly Leu Gly Gly Arg Ala Gly Tyr Tyr Asp
 245 250 255

Gly Ile Gly Ala Ala Arg Asp Val Ile Gln Asn His Leu Ile Gln Leu
 260 265 270

Leu Ala Leu Val Ala Met Glu Glu Pro Ile Ser Phe Val Pro Ala Gln
 275 280 285

Leu Gln Ala Glu Lys Ile Lys Val Leu Ser Ala Thr Lys Pro Cys Tyr
 290 295 300

Pro Leu Asp Lys Thr Ser Ala Arg Gly Gln Tyr Ala Ala Gly Trp Gln
 305 310 315 320

Gly Ser Glu Leu Val Lys Gly Leu Arg Glu Glu Asp Gly Phe Asn Pro
 325 330 335

Glu Ser Thr Thr Glu Thr Phe Ala Ala Cys Thr Leu Glu Ile Thr Ser
340 345 350

Arg Arg Trp Ala Gly Val Pro Phe Tyr Leu Arg Thr Gly Lys Arg Leu
355 360 365

Gly Arg Arg Val Thr Glu Ile Ala Val Val Phe Lys Asp Ala Pro His
370 375 380

Gln Pro Phe Asp Gly Asp Met Thr Val Ser Leu Gly Gln Asn Ala Ile
385 390 395 400

Val Ile Arg Val Gln Pro Asp Glu Gly Val Leu Ile Arg Phe Gly Ser
405 410 415

Lys Val Pro Gly Ser Ala Met Glu Val Arg Asp Val Asn Met Asp Phe
420 425 430

Ser Tyr Ser Glu Ser Phe Thr Glu Glu Ser Pro Glu Ala Tyr Glu Arg
435 440 445

Leu Ile Leu Asp Ala Leu Leu Asp Glu Ser Ser Leu Phe Pro Thr Asn
450 455 460

Glu Glu Val Glu Leu Ser Trp Lys Ile Leu Asp Pro Ile Leu Glu Ala
465 470 475 480

Trp Asp Ala Asp Gly Glu Pro Glu Asp Tyr Pro Ala Gly Thr Trp Gly
485 490 495

Pro Lys Ser Ala Asp Glu Met Leu Ser Arg Asn Gly His Thr Trp Arg
500 505 510

Arg Pro

<210> 5
<211> 1545
5 <212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<221> CDS
10 <222> (1)..(1542)
<223> alelo de zwf

<220>
<221> mutación
15 <222> (961)..(961)
<223> transición G -> A

<400> 5

gtg agc aca aac acg acc ccc tcc agc tgg aca aac cca ctg cgc gac	48
Val Ser Thr Asn Thr Thr Pro Ser Ser Trp Thr Asn Pro Leu Arg Asp	
1 5 10 15	
ccg cag gat aaa cga ctc ccc cgc atc gct ggc cct tcc ggc atg gtg	96
Pro Gln Asp Lys Arg Leu Pro Arg Ile Ala Gly Pro Ser Gly Met Val	
20 25 30	
atc ttc ggt gtc act ggc gac ttg gct cga aag aag ctg ctc ccc gcc	144
Ile Phe Gly Val Thr Gly Asp Leu Ala Arg Lys Lys Leu Leu Pro Ala	
35 40 45	
att tat gat cta gca aac cgc gga ttg ctg ccc cca gga ttc tgc ttg	192
Ile Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Gly Leu Leu Pro Pro Gly Phe Ser Leu	
50 55 60	
gta ggt tac ggc cgc cgc gaa tgg tcc aaa gaa gac ttt gaa aaa tac	240
Val Gly Tyr Gly Arg Arg Glu Trp Ser Lys Glu Asp Phe Glu Lys Tyr	
65 70 75 80	
gta cgc gat gcc gca agt gct ggt gct cgt acg gaa ttc cgt gaa aat	288
Val Arg Asp Ala Ala Ser Ala Gly Ala Arg Thr Glu Phe Arg Glu Asn	
85 90 95	
gtt tgg gag cgc ctc gcc gag ggt atg gaa ttt gtt cgc ggc aac ttt	336
Val Trp Glu Arg Leu Ala Glu Gly Met Glu Phe Val Arg Gly Asn Phe	
100 105 110	
gat gat gat gca gct ttc gac aac ctc gct gca aca ctc aag cgc atc	384
Asp Asp Asp Ala Ala Phe Asp Asn Leu Ala Ala Thr Leu Lys Arg Ile	
115 120 125	
gac aaa acc cgc ggc acc gcc ggc aac tgg gct tac tac ctg tcc att	432
Asp Lys Thr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Trp Ala Tyr Tyr Leu Ser Ile	
130 135 140	
cca cca gat tcc ttc aca gcg gtc tgc cac cag ctg gag cgt tcc ggc	480
Pro Pro Asp Ser Phe Thr Ala Val Cys His Gln Leu Glu Arg Ser Gly	
145 150 155 160	
atg gct gaa tcc acc gaa gaa gca tgg cgc cgc gtg atc atc gag aag	528
Met Ala Glu Ser Thr Glu Glu Ala Trp Arg Arg Val Ile Ile Glu Lys	
165 170 175	
cct ttc ggc cac aac ctc gaa tcc gca cac gag ctc aac cag ctg gtc	576
Pro Phe Gly His Asn Leu Glu Ser Ala His Glu Leu Asn Gln Leu Val	
180 185 190	
aac gca gtc ttc cca gaa tct tct gtg ttc cgc atc gac cac tat ttg	624
Asn Ala Val Phe Pro Glu Ser Ser Val Phe Arg Ile Asp His Tyr Leu	
195 200 205	
ggc aag gaa aca gtt caa aac atc ctg gct ctg cgt ttt gct aac cag	672
Gly Lys Glu Thr Val Gln Asn Ile Leu Ala Leu Arg Phe Ala Asn Gln	
210 215 220	
ctg ttt gag cca ctg tgg aac tcc aac tac gtt gac cac gtc cag atc	720
Leu Phe Glu Pro Leu Trp Asn Ser Asn Tyr Val Asp His Val Gln Ile	
225 230 235 240	

acc atg gct gaa gat att ggc ttg ggt gga cgt gct ggt tac tac gac Thr Met Ala Glu Asp Ile Gly Leu Gly Gly Arg Ala Gly Tyr Tyr Asp 245 250 255	768
ggc atc ggc gca gcc cgc gac gtc atc cag aac cac ctg atc cag ctc Gly Ile Gly Ala Ala Arg Asp Val Ile Gln Asn His Leu Ile Gln Leu 260 265 270	816
ttg gct ctg gtt gcc atg gaa gaa cca att tct ttc gtg cca gcg cag Leu Ala Leu Val Ala Met Glu Glu Pro Ile Ser Phe Val Pro Ala Gln 275 280 285	864
ctg cag gca gaa aag atc aag gtg ctc tct gcg aca aag ccg tgc tac Leu Gln Ala Glu Lys Ile Lys Val Leu Ser Ala Thr Lys Pro Cys Tyr 290 295 300	912
cca ttg gat aaa acc tcc gct cgt ggt cag tac gct gcc ggt tgg cag Pro Leu Asp Lys Thr Ser Ala Arg Gly Gln Tyr Ala Ala Gly Trp Gln 305 310 315 320	960
agc tct gag tta gtc aag gga ctt cgc gaa gaa gat ggc ttc aac cct Ser Ser Glu Leu Val Lys Gly Leu Arg Glu Glu Asp Gly Phe Asn Pro 325 330 335	1008
gag tcc acc act gag act ttt gcg gct tgt acc tta gag atc acg tct Glu Ser Thr Thr Glu Thr Phe Ala Ala Cys Thr Leu Glu Ile Thr Ser 340 345 350	1056
cgt cgc tgg gct ggt gtg ccg ttc tac ctg cgc acc ggt aag cgt ctt Arg Arg Trp Ala Gly Val Pro Phe Tyr Leu Arg Thr Gly Lys Arg Leu 355 360 365	1104
ggt cgc cgt gtt act gag att gcc gtg gtg ttt aaa gac gca cca cac Gly Arg Arg Val Thr Glu Ile Ala Val Val Phe Lys Asp Ala Pro His 370 375 380	1152
cag cct ttc gac ggc gac atg act gta tcc ctt ggc caa aac gcc atc Gln Pro Phe Asp Gly Asp Met Thr Val Ser Leu Gly Gln Asn Ala Ile 385 390 395 400	1200
gtg att cgc gtg cag cct gat gaa ggt gtg ctc atc cgc ttc ggt tcc Val Ile Arg Val Gln Pro Asp Glu Gly Val Leu Ile Arg Phe Gly Ser 405 410 415	1248
aag gtt cca ggt tct gcc atg gaa gtc cgt gac gtc aac atg gac ttc Lys Val Pro Gly Ser Ala Met Glu Val Arg Asp Val Asn Met Asp Phe 420 425 430	1296
tcc tac tca gaa tcc ttc act gaa gaa tca cct gaa gca tac gag cgc Ser Tyr Ser Glu Ser Phe Thr Glu Glu Ser Pro Glu Ala Tyr Glu Arg 435 440 445	1344
ctc att ttg gat gcg ctg tta gat gaa tcc agc ctc ttc cct acc aac Leu Ile Leu Asp Ala Leu Leu Asp Glu Ser Ser Leu Phe Pro Thr Asn 450 455 460	1392
gag gaa gtg gaa ctg agc tgg aag att ctg gat cca att ctt gaa gca Glu Glu Val Glu Leu Ser Trp Lys Ile Leu Asp Pro Ile Leu Glu Ala 465 470 475 480	1440

```

tgg gat gcc gat gga gaa cca gag gat tac cca gcg ggt acg tgg ggt      1488
Trp Asp Ala Asp Gly Glu Pro Glu Asp Tyr Pro Ala Gly Thr Trp Gly
      485                      490                      495

cca aag agc gct gat gaa atg ctt tcc cgc aac ggt cac acc tgg cgc      1536
Pro Lys Ser Ala Asp Glu Met Leu Ser Arg Asn Gly His Thr Trp Arg
      500                      505                      510

agg cca taa
Arg Pro
      1545

```

<210> 6

<211> 514

<212> PRT

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 6

```

Val Ser Thr Asn Thr Thr Pro Ser Ser Trp Thr Asn Pro Leu Arg Asp
1                      5                      10                      15

Pro Gln Asp Lys Arg Leu Pro Arg Ile Ala Gly Pro Ser Gly Met Val
      20                      25                      30

Ile Phe Gly Val Thr Gly Asp Leu Ala Arg Lys Lys Leu Leu Pro Ala
      35                      40                      45

Ile Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Gly Leu Leu Pro Pro Gly Phe Ser Leu
      50                      55                      60

Val Gly Tyr Gly Arg Arg Glu Trp Ser Lys Glu Asp Phe Glu Lys Tyr
65                      70                      75                      80

Val Arg Asp Ala Ala Ser Ala Gly Ala Arg Thr Glu Phe Arg Glu Asn
      85                      90                      95

Val Trp Glu Arg Leu Ala Glu Gly Met Glu Phe Val Arg Gly Asn Phe
      100                     105                     110

Asp Asp Asp Ala Ala Phe Asp Asn Leu Ala Ala Thr Leu Lys Arg Ile
      115                     120                     125

Asp Lys Thr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Trp Ala Tyr Tyr Leu Ser Ile
      130                     135                     140

Pro Pro Asp Ser Phe Thr Ala Val Cys His Gln Leu Glu Arg Ser Gly
145                     150                     155                     160

Met Ala Glu Ser Thr Glu Glu Ala Trp Arg Arg Val Ile Ile Glu Lys
      165                     170                     175

```

Pro Phe Gly His Asn Leu Glu Ser Ala His Glu Leu Asn Gln Leu Val
180 185 190

Asn Ala Val Phe Pro Glu Ser Ser Val Phe Arg Ile Asp His Tyr Leu
195 200 205

Gly Lys Glu Thr Val Gln Asn Ile Leu Ala Leu Arg Phe Ala Asn Gln
210 215 220

Leu Phe Glu Pro Leu Trp Asn Ser Asn Tyr Val Asp His Val Gln Ile
225 230 235 240

Thr Met Ala Glu Asp Ile Gly Leu Gly Gly Arg Ala Gly Tyr Tyr Asp
245 250 255

Gly Ile Gly Ala Ala Arg Asp Val Ile Gln Asn His Leu Ile Gln Leu
260 265 270

Leu Ala Leu Val Ala Met Glu Glu Pro Ile Ser Phe Val Pro Ala Gln
275 280 285

Leu Gln Ala Glu Lys Ile Lys Val Leu Ser Ala Thr Lys Pro Cys Tyr
290 295 300

Pro Leu Asp Lys Thr Ser Ala Arg Gly Gln Tyr Ala Ala Gly Trp Gln
305 310 315 320

Ser Ser Glu Leu Val Lys Gly Leu Arg Glu Glu Asp Gly Phe Asn Pro
325 330 335

Glu Ser Thr Thr Glu Thr Phe Ala Ala Cys Thr Leu Glu Ile Thr Ser
340 345 350

Arg Arg Trp Ala Gly Val Pro Phe Tyr Leu Arg Thr Gly Lys Arg Leu
355 360 365

Gly Arg Arg Val Thr Glu Ile Ala Val Val Phe Lys Asp Ala Pro His
370 375 380

Gln Pro Phe Asp Gly Asp Met Thr Val Ser Leu Gly Gln Asn Ala Ile
385 390 395 400

Val Ile Arg Val Gln Pro Asp Glu Gly Val Leu Ile Arg Phe Gly Ser
405 410 415

Lys Val Pro Gly Ser Ala Met Glu Val Arg Asp Val Asn Met Asp Phe
420 425 430

Ser Tyr Ser Glu Ser Phe Thr Glu Glu Ser Pro Glu Ala Tyr Glu Arg
435 440 445

Leu Ile Leu Asp Ala Leu Leu Asp Glu Ser Ser Leu Phe Pro Thr Asn
450 455 460

Glu Glu Val Glu Leu Ser Trp Lys Ile Leu Asp Pro Ile Leu Glu Ala
465 470 475 480

Trp Asp Ala Asp Gly Glu Pro Glu Asp Tyr Pro Ala Gly Thr Trp Gly
485 490 495

Pro Lys Ser Ala Asp Glu Met Leu Ser Arg Asn Gly His Thr Trp Arg
500 505 510

Arg Pro

<210> 7

<211> 1545

<212> ADN

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1542)

10 <223> alelo de zwf

<220>

<221> mutación

<222> (22)..(22)

15 <223> transversión T -> A

<220>

<221> mutación

<222> (961)..(961)

20 <223> transición G -> A

<400> 7

gtg agc aca aac acg acc ccc acc agc tgg aca aac cca ctg cgc gac 48
Val Ser Thr Asn Thr Thr Pro Thr Ser Trp Thr Asn Pro Leu Arg Asp
1 5 10 15

ccg cag gat aaa cga ctc ccc cgc atc gct ggc cct tcc ggc atg gtg 96
Pro Gln Asp Lys Arg Leu Pro Arg Ile Ala Gly Pro Ser Gly Met Val
20 25 30

atc ttc ggt gtc act ggc gac ttg gct cga aag aag ctg ctc ccc gcc 144
Ile Phe Gly Val Thr Gly Asp Leu Ala Arg Lys Lys Leu Leu Pro Ala
35 40 45

att tat gat cta gca aac cgc gga ttg ctg ccc cca gga ttc tcg ttg Ile Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Gly Leu Leu Pro Pro Gly Phe Ser Leu 50 55 60	192
gta ggt tac ggc cgc cgc gaa tgg tcc aaa gaa gac ttt gaa aaa tac Val Gly Tyr Gly Arg Arg Glu Trp Ser Lys Glu Asp Phe Glu Lys Tyr 65 70 75 80	240
gta cgc gat gcc gca agt gct ggt gct cgt acg gaa ttc cgt gaa aat Val Arg Asp Ala Ala Ser Ala Gly Ala Arg Thr Glu Phe Arg Glu Asn 85 90 95	288
gtt tgg gag cgc ctc gcc gag ggt atg gaa ttt gtt cgc ggc aac ttt Val Trp Glu Arg Leu Ala Glu Gly Met Glu Phe Val Arg Gly Asn Phe 100 105 110	336
gat gat gat gca gct ttc gac aac ctc gct gca aca ctc aag cgc atc Asp Asp Asp Ala Ala Phe Asp Asn Leu Ala Ala Thr Leu Lys Arg Ile 115 120 125	384
gac aaa acc cgc ggc acc gcc ggc aac tgg gct tac tac ctg tcc att Asp Lys Thr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Trp Ala Tyr Tyr Leu Ser Ile 130 135 140	432
cca cca gat tcc ttc aca gcg gtc tgc cac cag ctg gag cgt tcc ggc Pro Pro Asp Ser Phe Thr Ala Val Cys His Gln Leu Glu Arg Ser Gly 145 150 155 160	480
atg gct gaa tcc acc gaa gaa gca tgg cgc cgc gtg atc atc gag aag Met Ala Glu Ser Thr Glu Glu Ala Trp Arg Arg Val Ile Ile Glu Lys 165 170 175	528
cct ttc ggc cac aac ctc gaa tcc gca cac gag ctc aac cag ctg gtc Pro Phe Gly His Asn Leu Glu Ser Ala His Glu Leu Asn Gln Leu Val 180 185 190	576
aac gca gtc ttc cca gaa tct tct gtg ttc cgc atc gac cac tat ttg Asn Ala Val Phe Pro Glu Ser Ser Val Phe Arg Ile Asp His Tyr Leu 195 200 205	624
ggc aag gaa aca gtt caa aac atc ctg gct ctg cgt ttt gct aac cag Gly Lys Glu Thr Val Gln Asn Ile Leu Ala Leu Arg Phe Ala Asn Gln 210 215 220	672
ctg ttt gag cca ctg tgg aac tcc aac tac gtt gac cac gtc cag atc Leu Phe Glu Pro Leu Trp Asn Ser Asn Tyr Val Asp His Val Gln Ile 225 230 235 240	720
acc atg gct gaa gat att ggc ttg ggt gga cgt gct ggt tac tac gac Thr Met Ala Glu Asp Ile Gly Leu Gly Gly Arg Ala Gly Tyr Tyr Asp 245 250 255	768
ggc atc ggc gca gcc cgc gac gtc atc cag aac cac ctg atc cag ctc Gly Ile Gly Ala Ala Arg Asp Val Ile Gln Asn His Leu Ile Gln Leu 260 265 270	816
ttg gct ctg gtt gcc atg gaa gaa cca att tct ttc gtg cca gcg cag Leu Ala Leu Val Ala Met Glu Glu Pro Ile Ser Phe Val Pro Ala Gln 275 280 285	864

ctg cag gca gaa aag atc aag gtg ctc tct gcg aca aag ccg tgc tac Leu Gln Ala Glu Lys Ile Lys Val Leu Ser Ala Thr Lys Pro Cys Tyr 290 295 300	912
cca ttg gat aaa acc tcc gct cgt ggt cag tac gct gcc ggt tgg cag Pro Leu Asp Lys Thr Ser Ala Arg Gly Gln Tyr Ala Ala Gly Trp Gln 305 310 315 320	960
agc tct gag tta gtc aag gga ctt cgc gaa gaa gat ggc ttc aac cct Ser Ser Glu Leu Val Lys Gly Leu Arg Glu Glu Asp Gly Phe Asn Pro 325 330 335	1008
gag tcc acc act gag act ttt gcg gct tgt acc tta gag atc acg tct Glu Ser Thr Thr Glu Thr Phe Ala Ala Cys Thr Leu Glu Ile Thr Ser 340 345 350	1056
cgt cgc tgg gct ggt gtg ccg ttc tac ctg cgc acc ggt aag cgt ctt Arg Arg Trp Ala Gly Val Pro Phe Tyr Leu Arg Thr Gly Lys Arg Leu 355 360 365	1104
ggt cgc cgt gtt act gag att gcc gtg gtg ttt aaa gac gca cca cac Gly Arg Arg Val Thr Glu Ile Ala Val Val Phe Lys Asp Ala Pro His 370 375 380	1152
cag cct ttc gac ggc gac atg act gta tcc ctt ggc caa aac gcc atc Gln Pro Phe Asp Gly Asp Met Thr Val Ser Leu Gly Gln Asn Ala Ile 385 390 395 400	1200
gtg att cgc gtg cag cct gat gaa ggt gtg ctc atc cgc ttc ggt tcc Val Ile Arg Val Gln Pro Asp Glu Gly Val Leu Ile Arg Phe Gly Ser 405 410 415	1248
aag gtt cca ggt tct gcc atg gaa gtc cgt gac gtc aac atg gac ttc Lys Val Pro Gly Ser Ala Met Glu Val Arg Asp Val Asn Met Asp Phe 420 425 430	1296
tcc tac tca gaa tcc ttc act gaa gaa tca cct gaa gca tac gag cgc Ser Tyr Ser Glu Ser Phe Thr Glu Glu Ser Pro Glu Ala Tyr Glu Arg 435 440 445	1344
ctc att ttg gat gcg ctg tta gat gaa tcc agc ctc ttc cct acc aac Leu Ile Leu Asp Ala Leu Leu Asp Glu Ser Ser Leu Phe Pro Thr Asn 450 455 460	1392
gag gaa gtg gaa ctg agc tgg aag att ctg gat cca att ctt gaa gca Glu Glu Val Glu Leu Ser Trp Lys Ile Leu Asp Pro Ile Leu Glu Ala 465 470 475 480	1440
tgg gat gcc gat gga gaa cca gag gat tac cca gcg ggt acg tgg ggt Trp Asp Ala Asp Gly Glu Pro Glu Asp Tyr Pro Ala Gly Thr Trp Gly 485 490 495	1488
cca aag agc gct gat gaa atg ctt tcc cgc aac ggt cac acc tgg cgc Pro Lys Ser Ala Asp Glu Met Leu Ser Arg Asn Gly His Thr Trp Arg 500 505 510	1536
agg cca taa Arg Pro	1545

<210> 8

<211> 514

<212> PRT

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 8

```

Val Ser Thr Asn Thr Thr Pro Thr Ser Trp Thr Asn Pro Leu Arg Asp
1           5           10           15

Pro Gln Asp Lys Arg Leu Pro Arg Ile Ala Gly Pro Ser Gly Met Val
20           25           30

Ile Phe Gly Val Thr Gly Asp Leu Ala Arg Lys Lys Leu Leu Pro Ala
35           40           45

Ile Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Gly Leu Leu Pro Pro Gly Phe Ser Leu
50           55           60

Val Gly Tyr Gly Arg Arg Glu Trp Ser Lys Glu Asp Phe Glu Lys Tyr
65           70           75           80

Val Arg Asp Ala Ala Ser Ala Gly Ala Arg Thr Glu Phe Arg Glu Asn
85           90           95

Val Trp Glu Arg Leu Ala Glu Gly Met Glu Phe Val Arg Gly Asn Phe
100          105          110

Asp Asp Asp Ala Ala Phe Asp Asn Leu Ala Ala Thr Leu Lys Arg Ile
115          120          125

Asp Lys Thr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Trp Ala Tyr Tyr Leu Ser Ile
130          135          140

Pro Pro Asp Ser Phe Thr Ala Val Cys His Gln Leu Glu Arg Ser Gly
145          150          155          160

Met Ala Glu Ser Thr Glu Glu Ala Trp Arg Arg Val Ile Ile Glu Lys
165          170          175

Pro Phe Gly His Asn Leu Glu Ser Ala His Glu Leu Asn Gln Leu Val
180          185          190

Asn Ala Val Phe Pro Glu Ser Ser Val Phe Arg Ile Asp His Tyr Leu
195          200          205

Gly Lys Glu Thr Val Gln Asn Ile Leu Ala Leu Arg Phe Ala Asn Gln
210          215          220

```

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

Glu Glu Val Glu Leu Ser Trp Lys Ile Leu Asp Pro Ile Leu Glu Ala
465 470 475 480

Trp Asp Ala Asp Gly Glu Pro Glu Asp Tyr Pro Ala Gly Thr Trp Gly
485 490 495

Pro Lys Ser Ala Asp Glu Met Leu Ser Arg Asn Gly His Thr Trp Arg
500 505 510

Arg Pro

<210> 9
<211> 1545
<212> ADN
5 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1542)
10
<220>
<221> mutación
<222> (22)..(22)
<223> transversión T -> A
15
<220>
<221> mutación
<222> (138)..(138)
<223> transición C -> T
20
<220>
<221> mutación
<222> (279)..(279)
<223> transición C -> T
25
<220>
<221> mutación
<222> (738)..(738)
<223> transición T -> C
30
<220>
<221> mutación
<222> (777)..(777)
<223> transición C -> T
35
<220>
<221> mutación
<222> (906)..(906)
<223> transición G -> A
40
<220>
<221> mutación
<222> (961)..(961)
<223> transición G -> A
45
<400> 9

gtg agc aca aac acg acc ccc acc agc tgg aca aac cca ctg cgc gac	48
Val Ser Thr Asn Thr Thr Pro Thr Ser Trp Thr Asn Pro Leu Arg Asp	
1 5 10 15	
ccg cag gat aaa cga ctc ccc cgc atc gct ggc cct tcc ggc atg gtg	96
Pro Gln Asp Lys Arg Leu Pro Arg Ile Ala Gly Pro Ser Gly Met Val	
20 25 30	
atc ttc ggt gtc act ggc gac ttg gct cga aag aag ctg ctt ccc gcc	144
Ile Phe Gly Val Thr Gly Asp Leu Ala Arg Lys Lys Leu Leu Pro Ala	
35 40 45	
att tat gat cta gca aac cgc gga ttg ctg ccc cca gga ttc tcg ttg	192
Ile Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Gly Leu Leu Pro Pro Gly Phe Ser Leu	
50 55 60	
gta ggt tac ggc cgc cgc gaa tgg tcc aaa gaa gac ttt gaa aaa tac	240
Val Gly Tyr Gly Arg Arg Glu Trp Ser Lys Glu Asp Phe Glu Lys Tyr	
65 70 75 80	
gta cgc gat gcc gca agt gct ggt gct cgt acg gaa ttt cgt gaa aat	288
Val Arg Asp Ala Ser Ala Gly Ala Arg Thr Glu Phe Arg Glu Asn	
85 90 95	
gtt tgg gag cgc ctc gcc gag ggt atg gaa ttt gtt cgc ggc aac ttt	336
Val Trp Glu Arg Leu Ala Glu Gly Met Glu Phe Val Arg Gly Asn Phe	
100 105 110	
gat gat gat gca gct ttc gac aac ctc gct gca aca ctc aag cgc atc	384
Asp Asp Asp Ala Ala Phe Asp Asn Leu Ala Ala Thr Leu Lys Arg Ile	
115 120 125	
gac aaa acc cgc ggc acc gcc ggc aac tgg gct tac tac ctg tcc att	432
Asp Lys Thr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Trp Ala Tyr Tyr Leu Ser Ile	
130 135 140	
cca cca gat tcc ttc aca gcg gtc tgc cac cag ctg gag cgt tcc ggc	480
Pro Pro Asp Ser Phe Thr Ala Val Cys His Gln Leu Glu Arg Ser Gly	
145 150 155 160	
atg gct gaa tcc acc gaa gaa gca tgg cgc cgc gtg atc atc gag aag	528
Met Ala Glu Ser Thr Glu Glu Ala Trp Arg Arg Val Ile Ile Glu Lys	
165 170 175	
cct ttc ggc cac aac ctc gaa tcc gca cac gag ctc aac cag ctg gtc	576
Pro Phe Gly His Asn Leu Glu Ser Ala His Glu Leu Asn Gln Leu Val	
180 185 190	
aac gca gtc ttc cca gaa tct tct gtg ttc cgc atc gac cac tat ttg	624
Asn Ala Val Phe Pro Glu Ser Ser Val Phe Arg Ile Asp His Tyr Leu	
195 200 205	
ggc aag gaa aca gtt caa aac atc ctg gct ctg cgt ttt gct aac cag	672
Gly Lys Glu Thr Val Gln Asn Ile Leu Ala Leu Arg Phe Ala Asn Gln	
210 215 220	
ctg ttt gag cca ctg tgg aac tcc aac tac gtt gac cac gtc cag atc	720
Leu Phe Glu Pro Leu Trp Asn Ser Asn Tyr Val Asp His Val Gln Ile	
225 230 235 240	

acc atg gct gaa gat atc ggc ttg ggt gga cgt gct ggt tac tac gac Thr Met Ala Glu Asp Ile Gly Leu Gly Gly Arg Ala Gly Tyr Tyr Asp 245 250 255	768
ggc atc ggt gca gcc cgc gac gtc atc cag aac cac ctg atc cag ctc Gly Ile Gly Ala Ala Arg Asp Val Ile Gln Asn His Leu Ile Gln Leu 260 265 270	816
ttg gct ctg gtt gcc atg gaa gaa cca att tct ttc gtg cca gcg cag Leu Ala Leu Val Ala Met Glu Glu Pro Ile Ser Phe Val Pro Ala Gln 275 280 285	864
ctg cag gca gaa aag atc aag gtg ctc tct gcg aca aag cca tgc tac Leu Gln Ala Glu Lys Ile Lys Val Leu Ser Ala Thr Lys Pro Cys Tyr 290 295 300	912
cca ttg gat aaa acc tcc gct cgt ggt cag tac gct gcc ggt tgg cag Pro Leu Asp Lys Thr Ser Ala Arg Gly Gln Tyr Ala Ala Gly Trp Gln 305 310 315 320	960
agc tct gag tta gtc aag gga ctt cgc gaa gaa gat ggc ttc aac cct Ser Ser Glu Leu Val Lys Gly Leu Arg Glu Glu Asp Gly Phe Asn Pro 325 330 335	1008
gag tcc acc act gag act ttt gcg gct tgt acc tta gag atc acg tct Glu Ser Thr Thr Glu Thr Phe Ala Ala Cys Thr Leu Glu Ile Thr Ser 340 345 350	1056
cgt cgc tgg gct ggt gtg ccg ttc tac ctg cgc acc ggt aag cgt ctt Arg Arg Trp Ala Gly Val Pro Phe Tyr Leu Arg Thr Gly Lys Arg Leu 355 360 365	1104
ggt cgc cgt gtt act gag att gcc gtg gtg ttt aaa gac gca cca cac Gly Arg Arg Val Thr Glu Ile Ala Val Val Phe Lys Asp Ala Pro His 370 375 380	1152
cag cct ttc gac gcc gac atg act gta tcc ctt gcc caa aac gcc atc Gln Pro Phe Asp Gly Asp Met Thr Val Ser Leu Gly Gln Asn Ala Ile 385 390 395 400	1200
gtg att cgc gtg cag cct gat gaa ggt gtg ctc atc cgc ttc ggt tcc Val Ile Arg Val Gln Pro Asp Glu Gly Val Leu Ile Arg Phe Gly Ser 405 410 415	1248
aag gtt cca ggt tct gcc atg gaa gtc cgt gac gtc aac atg gac ttc Lys Val Pro Gly Ser Ala Met Glu Val Arg Asp Val Asn Met Asp Phe 420 425 430	1296
tcc tac tca gaa tcc ttc act gaa gaa tca cct gaa gca tac gag cgc Ser Tyr Ser Glu Ser Phe Thr Glu Glu Ser Pro Glu Ala Tyr Glu Arg 435 440 445	1344
ctc att ttg gat gcg ctg tta gat gaa tcc agc ctc ttc cct acc aac Leu Ile Leu Asp Ala Leu Leu Asp Glu Ser Ser Leu Phe Pro Thr Asn 450 455 460	1392
gag gaa gtg gaa ctg agc tgg aag att ctg gat cca att ctt gaa gca Glu Glu Val Glu Leu Ser Trp Lys Ile Leu Asp Pro Ile Leu Glu Ala 465 470 475 480	1440

```

tgg gat gcc gat gga gaa cca gag gat tac cca gcg ggt acg tgg ggt      1488
Trp Asp Ala Asp Gly Glu Pro Glu Asp Tyr Pro Ala Gly Thr Trp Gly
                        485                        490                        495

cca aag agc gct gat gaa atg ctt tcc cgc aac ggt cac acc tgg cgc      1536
Pro Lys Ser Ala Asp Glu Met Leu Ser Arg Asn Gly His Thr Trp Arg
                        500                        505                        510

agg cca taa      1545
Arg Pro

```

<210> 10

<211> 514

<212> PRT

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 10

```

Val Ser Thr Asn Thr Thr Pro Thr Ser Trp Thr Asn Pro Leu Arg Asp
1                               5                               10                               15

Pro Gln Asp Lys Arg Leu Pro Arg Ile Ala Gly Pro Ser Gly Met Val
                20                               25                               30

Ile Phe Gly Val Thr Gly Asp Leu Ala Arg Lys Lys Leu Leu Pro Ala
                35                               40                               45

Ile Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Gly Leu Leu Pro Pro Gly Phe Ser Leu
                50                               55                               60

Val Gly Tyr Gly Arg Arg Glu Trp Ser Lys Glu Asp Phe Glu Lys Tyr
65                               70                               75                               80

Val Arg Asp Ala Ala Ser Ala Gly Ala Arg Thr Glu Phe Arg Glu Asn
                85                               90                               95

Val Trp Glu Arg Leu Ala Glu Gly Met Glu Phe Val Arg Gly Asn Phe
                100                              105                              110

Asp Asp Asp Ala Ala Phe Asp Asn Leu Ala Ala Thr Leu Lys Arg Ile
                115                              120                              125

Asp Lys Thr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Trp Ala Tyr Tyr Leu Ser Ile
                130                              135                              140

Pro Pro Asp Ser Phe Thr Ala Val Cys His Gln Leu Glu Arg Ser Gly
145                              150                              155                              160

Met Ala Glu Ser Thr Glu Glu Ala Trp Arg Arg Val Ile Ile Glu Lys
                165                              170                              175

```

Pro Phe Gly His Asn Leu Glu Ser Ala His Glu Leu Asn Gln Leu Val
180 185 190

Asn Ala Val Phe Pro Glu Ser Ser Val Phe Arg Ile Asp His Tyr Leu
195 200 205

Gly Lys Glu Thr Val Gln Asn Ile Leu Ala Leu Arg Phe Ala Asn Gln
210 215 220

Leu Phe Glu Pro Leu Trp Asn Ser Asn Tyr Val Asp His Val Gln Ile
225 230 235 240

Thr Met Ala Glu Asp Ile Gly Leu Gly Gly Arg Ala Gly Tyr Tyr Asp
245 250 255

Gly Ile Gly Ala Ala Arg Asp Val Ile Gln Asn His Leu Ile Gln Leu
260 265 270

Leu Ala Leu Val Ala Met Glu Glu Pro Ile Ser Phe Val Pro Ala Gln
275 280 285

Leu Gln Ala Glu Lys Ile Lys Val Leu Ser Ala Thr Lys Pro Cys Tyr
290 295 300

Pro Leu Asp Lys Thr Ser Ala Arg Gly Gln Tyr Ala Ala Gly Trp Gln
305 310 315 320

Ser Ser Glu Leu Val Lys Gly Leu Arg Glu Glu Asp Gly Phe Asn Pro
325 330 335

Glu Ser Thr Thr Glu Thr Phe Ala Ala Cys Thr Leu Glu Ile Thr Ser
340 345 350

Arg Arg Trp Ala Gly Val Pro Phe Tyr Leu Arg Thr Gly Lys Arg Leu
355 360 365

Gly Arg Arg Val Thr Glu Ile Ala Val Val Phe Lys Asp Ala Pro His
370 375 380

Gln Pro Phe Asp Gly Asp Met Thr Val Ser Leu Gly Gln Asn Ala Ile
385 390 395 400

Val Ile Arg Val Gln Pro Asp Glu Gly Val Leu Ile Arg Phe Gly Ser
405 410 415

Lys Val Pro Gly Ser Ala Met Glu Val Arg Asp Val Asn Met Asp Phe
420 425 430

Ser Tyr Ser Glu Ser Phe Thr Glu Glu Ser Pro Glu Ala Tyr Glu Arg
435 440 445

Leu Ile Leu Asp Ala Leu Leu Asp Glu Ser Ser Leu Phe Pro Thr Asn
450 455 460

Glu Glu Val Glu Leu Ser Trp Lys Ile Leu Asp Pro Ile Leu Glu Ala
465 470 475 480

Trp Asp Ala Asp Gly Glu Pro Glu Asp Tyr Pro Ala Gly Thr Trp Gly
485 490 495

Pro Lys Ser Ala Asp Glu Met Leu Ser Arg Asn Gly His Thr Trp Arg
500 505 510

Arg Pro

<210> 11

<211> 2100

<212> ADN

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> mutación

<222> (208)..(208)

10 <223> transición A -> G

<220>

<221> mutación

<222> (235)..(235)

15 <223> transición G -> A

<220>

<221> mutación

<222> (245)..(245)

20 <223> transición T -> C

<220>

<221> mutación

<222> (257)..(257)

25 <223> transición A -> G

<220>

<221> mutación

<222> (299)..(299)

30 <223> transición A -> G

<220>

<221> CDS

<222> (308)..(1849)

<220>
 <221> mutación
 <222> (329)..(329)
 <223> transversión T -> A
 5
 <220>
 <221> mutación
 <222> (445)..(445)
 <223> transición C -> T
 10
 <220>
 <221> mutación
 <222> (586)..(586)
 <223> transición C -> T
 15
 <220>
 <221> mutación
 <222> (1045)..(1045)
 <223> transición T -> C
 20
 <220>
 <221> mutación
 <222> (1084)..(1084)
 <223> transición C -> T
 25
 <220>
 <221> mutación
 <222> (1213)..(1213)
 <223> transición G -> A
 30
 <220>
 <221> mutación
 <222> (1268)..(1268)
 <223> Transición G -> A
 35
 <400> 11

 tcgacgcgggt tctggagcag ggcaacctgc acggtgacac cctgtccaac tccgcggcag 60
 aagctgacgc tgtgttctcc cagcttgagg ctctgggcgt tgacttgcca gatgtcttcc 120
 aggtcctgga gaccgaggggt gtggacaagt tcgttgcttc ttggagcgaa ctgcttgagt 180
 ccatggaagc tcgcctgaag tagaatcggc acgctgcac agtaacggcg acataaaatc 240
 gaatcagttc gatcttgtgt ggccggtaca catctttcat taaagaaagg atcgtgacgc 300
 taccatc gtg agc aca aac acg acc ccc acc agc tgg aca aac cca ctg 349
 Val Ser Thr Asn Thr Thr Pro Thr Ser Trp Thr Asn Pro Leu
 1 5 10
 cgc gac ccg cag gat aaa cga ctc ccc cgc atc gct ggc cct tcc ggc 397
 Arg Asp Pro Gln Asp Lys Arg Leu Pro Arg Ile Ala Gly Pro Ser Gly
 15 20 25 30
 atg gtg atc ttc ggt gtc act ggc gac ttg gct cga aag aag ctg ctt 445
 Met Val Ile Phe Gly Val Thr Gly Asp Leu Ala Arg Lys Lys Leu Leu
 35 40 45
 ccc gcc att tat gat cta gca aac cgc gga ttg ctg ccc cca gga ttc 493
 Pro Ala Ile Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Gly Leu Leu Pro Pro Gly Phe
 50 55 60

tcg ttg gta ggt tac ggc cgc cgc gaa tgg tcc aaa gaa gac ttt gaa Ser Leu Val Gly Tyr Gly Arg Arg Glu Trp Ser Lys Glu Asp Phe Glu 65 70 75	541
aaa tac gta cgc gat gcc gca agt gct ggt gct cgt acg gaa ttt cgt Lys Tyr Val Arg Asp Ala Ala Ser Ala Gly Ala Arg Thr Glu Phe Arg 80 85 90	589
gaa aat gtt tgg gag cgc ctc gcc gag ggt atg gaa ttt gtt cgc ggc Glu Asn Val Trp Glu Arg Leu Ala Glu Gly Met Glu Phe Val Arg Gly 95 100 105 110	637
aac ttt gat gat gat gca gct ttc gac aac ctc gct gca aca ctc aag Asn Phe Asp Asp Asp Ala Ala Phe Asp Asn Leu Ala Ala Thr Leu Lys 115 120 125	685
cgc atc gac aaa acc cgc ggc acc gcc ggc aac tgg gct tac tac ctg Arg Ile Asp Lys Thr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Trp Ala Tyr Tyr Leu 130 135 140	733
tcc att cca cca gat tcc ttc aca gcg gtc tgc cac cag ctg gag cgt Ser Ile Pro Pro Asp Ser Phe Thr Ala Val Cys His Gln Leu Glu Arg 145 150 155	781
tcc ggc atg gct gaa tcc acc gaa gaa gca tgg cgc cgc gtg atc atc Ser Gly Met Ala Glu Ser Thr Glu Glu Ala Trp Arg Arg Val Ile Ile 160 165 170	829
gag aag cct ttc ggc cac aac ctc gaa tcc gca cac gag ctc aac cag Glu Lys Pro Phe Gly His Asn Leu Glu Ser Ala His Glu Leu Asn Gln 175 180 185 190	877
ctg gtc aac gca gtc ttc cca gaa tct tct gtg ttc cgc atc gac cac Leu Val Asn Ala Val Phe Pro Glu Ser Ser Val Phe Arg Ile Asp His 195 200 205	925
tat ttg ggc aag gaa aca gtt caa aac atc ctg gct ctg cgt ttt gct Tyr Leu Gly Lys Glu Thr Val Gln Asn Ile Leu Ala Leu Arg Phe Ala 210 215 220	973
aac cag ctg ttt gag cca ctg tgg aac tcc aac tac gtt gac cac gtc Asn Gln Leu Phe Glu Pro Leu Trp Asn Ser Asn Tyr Val Asp His Val 225 230 235	1021
cag atc acc atg gct gaa gat atc ggc ttg ggt gga cgt gct ggt tac Gln Ile Thr Met Ala Glu Asp Ile Gly Leu Gly Gly Arg Ala Gly Tyr 240 245 250	1069
tac gac ggc atc ggt gca gcc cgc gac gtc atc cag aac cac ctg atc Tyr Asp Gly Ile Gly Ala Ala Arg Asp Val Ile Gln Asn His Leu Ile 255 260 265 270	1117
cag ctc ttg gct ctg gtt gcc atg gaa gaa cca att tct ttc gtg cca Gln Leu Leu Ala Leu Val Ala Met Glu Glu Pro Ile Ser Phe Val Pro 275 280 285	1165
gcg cag ctg cag gca gaa aag atc aag gtg ctc tct gcg aca aag cca Ala Gln Leu Gln Ala Glu Lys Ile Lys Val Leu Ser Ala Thr Lys Pro 290 295 300	1213

tgc tac cca ttg gat aaa acc tcc gct cgt ggt cag tac gct gcc ggt Cys Tyr Pro Leu Asp Lys Thr Ser Ala Arg Gly Gln Tyr Ala Ala Gly 305 310 315	1261
tgg cag agc tct gag tta gtc aag gga ctt cgc gaa gaa gat ggc ttc Trp Gln Ser Ser Glu Leu Val Lys Gly Leu Arg Glu Glu Asp Gly Phe 320 325 330	1309
aac cct gag tcc acc act gag act ttt gcg gct tgt acc tta gag atc Asn Pro Glu Ser Thr Thr Glu Thr Phe Ala Ala Cys Thr Leu Glu Ile 335 340 345 350	1357
acg tct cgt cgc tgg gct ggt gtg ccg ttc tac ctg cgc acc ggt aag Thr Ser Arg Arg Trp Ala Gly Val Pro Phe Tyr Leu Arg Thr Gly Lys 355 360 365	1405
cgt ctt ggt cgc cgt gtt act gag att gcc gtg gtg ttt aaa gac gca Arg Leu Gly Arg Arg Val Thr Glu Ile Ala Val Val Phe Lys Asp Ala 370 375 380	1453
cca cac cag cct ttc gac ggc gac atg act gta tcc ctt ggc caa aac Pro His Gln Pro Phe Asp Gly Asp Met Thr Val Ser Leu Gly Gln Asn 385 390 395	1501
gcc atc gtg att cgc gtg cag cct gat gaa ggt gtg ctc atc cgc ttc Ala Ile Val Ile Arg Val Gln Pro Asp Glu Gly Val Leu Ile Arg Phe 400 405 410	1549
ggt tcc aag gtt cca ggt tct gcc atg gaa gtc cgt gac gtc aac atg Gly Ser Lys Val Pro Gly Ser Ala Met Glu Val Arg Asp Val Asn Met 415 420 425 430	1597
gac ttc tcc tac tca gaa tcc ttc act gaa gaa tca cct gaa gca tac Asp Phe Ser Tyr Ser Glu Ser Phe Thr Glu Glu Ser Pro Glu Ala Tyr 435 440 445	1645
gag cgc ctc att ttg gat gcg ctg tta gat gaa tcc agc ctc ttc cct Glu Arg Leu Ile Leu Asp Ala Leu Leu Asp Glu Ser Ser Leu Phe Pro 450 455 460	1693
acc aac gag gaa gtg gaa ctg agc tgg aag att ctg gat cca att ctt Thr Asn Glu Glu Val Glu Leu Ser Trp Lys Ile Leu Asp Pro Ile Leu 465 470 475	1741
gaa gca tgg gat gcc gat gga gaa cca gag gat tac cca gcg ggt acg Glu Ala Trp Asp Ala Asp Gly Glu Pro Glu Asp Tyr Pro Ala Gly Thr 480 485 490	1789
tgg ggt cca aag agc gct gat gaa atg ctt tcc cgc aac ggt cac acc Trp Gly Pro Lys Ser Ala Asp Glu Met Leu Ser Arg Asn Gly His Thr 495 500 505 510	1837
tgg cgc agg cca taatttaggg gcaaaaaatg atctttgaac ttccggatac Trp Arg Arg Pro	1889
caccacccag caaatttcca agaccctaac tcgactgcgt gaatcgggca cccaggtcac	1949
caccggccga gtgctcacc tcacgtggt cactgactcc gaaagcgatg tcgctgcagt	2009
taccgagtcc accaatgaag cctcgcgcga gcacccatct cgcgtgatca ttttggtggt	2069
tggcgataaa actgcagaaa acaaagttga c	2100

<210> 12
 <211> 514
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

5

<400> 12

```

Val Ser Thr Asn Thr Thr Pro Thr Ser Trp Thr Asn Pro Leu Arg Asp
1          5          10          15

Pro Gln Asp Lys Arg Leu Pro Arg Ile Ala Gly Pro Ser Gly Met Val
          20          25          30

Ile Phe Gly Val Thr Gly Asp Leu Ala Arg Lys Lys Leu Leu Pro Ala
          35          40          45

Ile Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Gly Leu Leu Pro Pro Gly Phe Ser Leu
          50          55          60

Val Gly Tyr Gly Arg Arg Glu Trp Ser Lys Glu Asp Phe Glu Lys Tyr
65          70          75          80

Val Arg Asp Ala Ala Ser Ala Gly Ala Arg Thr Glu Phe Arg Glu Asn
          85          90          95

Val Trp Glu Arg Leu Ala Glu Gly Met Glu Phe Val Arg Gly Asn Phe
          100         105         110

Asp Asp Asp Ala Ala Phe Asp Asn Leu Ala Ala Thr Leu Lys Arg Ile
          115         120         125

Asp Lys Thr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Trp Ala Tyr Tyr Leu Ser Ile
          130         135         140

Pro Pro Asp Ser Phe Thr Ala Val Cys His Gln Leu Glu Arg Ser Gly
145         150         155         160

Met Ala Glu Ser Thr Glu Glu Ala Trp Arg Arg Val Ile Ile Glu Lys
          165         170         175

Pro Phe Gly His Asn Leu Glu Ser Ala His Glu Leu Asn Gln Leu Val
          180         185         190

Asn Ala Val Phe Pro Glu Ser Ser Val Phe Arg Ile Asp His Tyr Leu
          195         200         205
    
```

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

Glu Glu Val Glu Leu Ser Trp Lys Ile Leu Asp Pro Ile Leu Glu Ala
465 470 475 480

Trp Asp Ala Asp Gly Glu Pro Glu Asp Tyr Pro Ala Gly Thr Trp Gly
485 490 495

Pro Lys Ser Ala Asp Glu Met Leu Ser Arg Asn Gly His Thr Trp Arg
500 505 510

Arg Pro

<210> 13

<211> 87

5 <212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

10 <222> (1).. (87)

<220>

<221> característica variada

<222> (43).. (45)

15 <223> n es a, c, g, or t

<400> 13

gat aaa acc tcc gct cgt ggt cag tac gct gcc ggt tgg cag nnn tct 48
Asp Lys Thr Ser Ala Arg Gly Gln Tyr Ala Ala Gly Trp Gln Xaa Ser
1 5 10 15

gag tta gtc aag gga ctt cgc gaa gaa gat ggc ttc aac 87
Glu Leu Val Lys Gly Leu Arg Glu Glu Asp Gly Phe Asn
20 25

<210> 14

20 <211> 29

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

25 <221> característica variada

<222> (15)..(15)

<223> El 'Xaa' en la posición 15 representa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, or Phe.

30 <400> 14

Asp Lys Thr Ser Ala Arg Gly Gln Tyr Ala Ala Gly Trp Gln Xaa Ser
1 5 10 15

Glu Leu Val Lys Gly Leu Arg Glu Glu Asp Gly Phe Asn
20 25

<210> 15

<211> 87

<212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 5 <221> CDS
 <222> (1).. (87)

<400> 15

gat	aaa	acc	tcc	gct	cgt	ggt	cag	tac	gct	gcc	ggt	tgg	cag	agc	tct	48
Asp	Lys	Thr	Ser	Ala	Arg	Gly	Gln	Tyr	Ala	Ala	Gly	Trp	Gln	Ser	Ser	
1				5				10					15			

gag	tta	gtc	aag	gga	ctt	cgc	gaa	gaa	gat	ggc	ttc	aac				87
Glu	Leu	Val	Lys	Gly	Leu	Arg	Glu	Glu	Asp	Gly	Phe	Asn				
			20				25									

10 <210> 16
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

15 <400> 16

Asp	Lys	Thr	Ser	Ala	Arg	Gly	Gln	Tyr	Ala	Ala	Gly	Trp	Gln	Ser	Ser	
1				5				10					15			

Glu	Leu	Val	Lys	Gly	Leu	Arg	Glu	Glu	Asp	Gly	Phe	Asn				
			20				25									

<210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <221> característica variada
 <222> (1)..(20)
 25 <223> cebador zwf-K1

<400> 17
 aaggatcgtg acactacat 20

30 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

35 <220>
 <221> característica variada
 <222> (1)..(20)
 <223> cebador zwf-K2

40 <400> 18
 ggtggtatcc ggaagttcaa 20

<210> 19

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

5 <220>
 <221> característica variada
 <222> (1).. (20)
 <223> cebador zwf-L1

10 <400> 19
 agaagctgac gctgtgtct 20

<210> 20
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <221> característica variada
 20 <222> (1).. (20)
 <223> cebador zwf-L2

<400> 20
 cattggtgga ctcgtaact 20

25 <210> 21
 <211> 1263
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

30 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (1263)
 <223> gen lysC de tipo silvestre

35 <400> 21
 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

gaa ctt cta gaa ctt gca gcg gca gtg aat ccc gtt ccg cca gct cgt Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg 50 55 60	192
gaa atg gat atg ctc ctg act gct ggt gag cgt att tct aac gct ctc Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu 65 70 75 80	240
gtc gcc atg gct att gag tcc ctt ggc gca gaa gcc caa tct ttc acg Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr 85 90 95	288
ggc tct cag gct ggt gtg ctc acc acc gag cgc cac gga aac gca cgc Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg 100 105 110	336
att gtt gat gtc act cca ggt cgt gtg cgt gaa gca ctc gat gag ggc Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly 115 120 125	384
aag atc tgc att gtt gct ggt ttc cag ggt gtt aat aaa gaa acc cgc Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg 130 135 140	432
gat gtc acc acg ttg ggt cgt ggt ggt tct gac acc act gca gtt gcg Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala 145 150 155 160	480
ttg gca gct gct ttg aac gct gat gtg tgt gag att tac tcg gac gtt Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val 165 170 175	528
gac ggt gtg tat acc gct gac ccg cgc atc gtt cct aat gca cag aag Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys 180 185 190	576
ctg gaa aag ctc agc ttc gaa gaa atg ctg gaa ctt gct gct gtt ggc Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly 195 200 205	624
tcc aag att ttg gtg ctg cgc agt gtt gaa tac gct cgt gca ttc aat Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn 210 215 220	672
gtg cca ctt cgc gta cgc tcg tct tat agt aat gat ccc ggc act ttg Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu 225 230 235 240	720
att gcc ggc tct atg gag gat att cct gtg gaa gaa gca gtc ctt acc Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr 245 250 255	768
ggt gtc gca acc gac aag tcc gaa gcc aaa gta acc gtt ctg ggt att Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile 260 265 270	816
tcc gat aag cca ggc gag gct gcg aag gtt ttc cgt gcg ttg gct gat Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp 275 280 285	864

```

gca gaa atc aac att gac atg gtt ctg cag aac gtc tct tct gta gaa      912
Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu
290                               295                               300

gac ggc acc acc gac atc acc ttc acc tgc cct cgt tcc gac ggc cgc      960
Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg
305                               310                               315                               320

cgc gcg atg gag atc ttg aag aag ctt cag gtt cag ggc aac tgg acc      1008
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 ggt gct      1056
Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala
340                               345                               350

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

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

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

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

gca ggc acc gga cgc
Ala Gly Thr Gly Arg
420

```

<210> 22

<211> 421

<212> PRT

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 22

```

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

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

<210> 23

<211> 30

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador zwf-int1-bam

10 <400> 23

ctagggatcc acgtacgcga tgccgcaagt 30

<210> 24

<211> 30

15 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador zwf-int2-bam

20

<400> 24

ctagggatcc tcaggctgca cgcgatcac 30

REIVINDICACIONES

1. Mutantes aislados de bacterias corineformes, que contienen un gen, que codifica un polipéptido con la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, **caracterizado porque** el polipéptido abarca una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2, en la que en la posición 321 está contenida la L-serina.
2. Mutantes de bacterias corineformes de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizados porque** en el caso de las bacterias corineformes se trata de una bacteria escogida entre el conjunto que se compone de *Corynebacterium efficiens*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium thermoaminogenes* y *Corynebacterium aminogenes*.
3. Mutantes de bacterias corineformes de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizados porque** se trata de *Corynebacterium glutamicum*.
4. Mutantes de bacterias corineformes de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2 ó 3, **caracterizados porque** se trata de unas bacterias que segregan un L-aminoácido.
5. Mutantes de bacterias corineformes de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizados porque** se trata de unas bacterias que segregan la L-lisina o el L-triptófano.
6. Mutantes de bacterias corineformes de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 5, **caracterizados porque** el aminoácido L-serina se intercambia en la posición 8 por otro aminoácido proteinógeno.
7. Mutantes de bacterias corineformes de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 6, **caracterizados porque** la proteína codificada abarca una secuencia de aminoácidos que se escoge entre el conjunto que se compone de
 - a) la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:10,
 - b) la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:10 inclusive una o como máximo 5 inserción/inserciones o supresión/supresiones de aminoácidos, diferenciándose la actividad enzimática como máximo en un 5% de la actividad del polipéptido con la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:6, 8 o 10, y estando contenida la L-serina en la posición correspondiente a la posición 321.
8. Mutantes de bacterias corineformes de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizados porque** el gen abarca la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:9.
9. Mutantes de bacterias corineformes, **caracterizados porque** éstos son obtenibles mediante las siguientes etapas:
 - a) tratamiento de una bacteria corineforme, que posee la capacidad de segregar aminoácidos, con un agente mutágeno,
 - b) aislamiento y multiplicación del mutante producido en a),
 - c) puesta a disposición de un ácido nucleico procedente del mutante obtenido en b),
 - d) producción de una molécula de ácido nucleico mediando utilización de la reacción en cadena de la polimerasa, del ácido nucleico procedente de c), y de un par de cebadores, que se compone de un primer cebador, que comprende por lo menos 15 nucleótidos consecutivos escogidos a partir de la secuencia de nucleótidos que se encuentra entre las posiciones 1 y 1.267 de la SEQ ID NO: 3 o de la SEQ ID NO:11, y de un segundo cebador, que comprende por lo menos 15 nucleótidos consecutivos, escogidos a partir de la secuencia complementaria de nucleótidos que se encuentra entre las posiciones 2.100 y 1.271 de la SEQ ID NO: 3 o 11,
 - e) determinación de la secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico obtenida en d), y determinación de la secuencia de aminoácidos codificada,
 - f) eventualmente comparación de la secuencia de aminoácidos determinada en f) con la SEQ ID NO: 6, 8 o 10, y
 - g) identificación de un mutante, que contiene un polinucleótido, que codifica un polipéptido con la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que contiene la L-serina en la posición correspondiente a la posición 321 de la SEQ ID NO:2.
10. Un polinucleótido aislado, que codifica un polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO:2 con la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que contiene la L-serina en la posición 321 de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2.
11. Polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado porque** la proteína codificada contiene una secuencia de aminoácidos que se escoge entre el conjunto que se compone de
 - a) la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:10,
 - b) la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:10 inclusive una o como máximo 5 inserción/inserciones de aminoácidos, diferenciándose la actividad enzimática como

máximo en un 5 % de la actividad del polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6, 8 o 10, y estando contenida la L-serina en la posición correspondiente a la posición 321.

12. Polinucleótido aislado de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 10 u 11, **caracterizado porque** el polipéptido codificado abarca la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:10.
13. Polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 12, **caracterizado porque** la secuencia de nucleótidos abarca la SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:9.
14. Polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizado porque** la secuencia de nucleótidos abarca la SEQ ID NO:11.
15. Un fragmento aislado de un polinucleótido, que abarca una molécula de ácido nucleico, que codifica por lo menos un marco de lectura con una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 307 hasta 335 de la SEQ ID NO:2, estando contenida la L-serina en la posición 321 de la SEQ ID NO:2.
16. Polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 15, **caracterizado porque** codifica un marco de lectura con una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 307 hasta 335 de la SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:10.
17. Polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 15, **caracterizado porque** la secuencia de aminoácidos contiene uno o varios intercambio(s) conservativo(s) de aminoácidos, no concerniendo a la posición 321 los intercambios conservativos de aminoácidos.
18. Polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 15, **caracterizado porque** contiene una o varias mutación/mutaciones muda(s).
19. Polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 16, **caracterizado porque** abarca por lo menos una secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 919 hasta 1.005 de la SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:9.
20. Procedimiento para la producción de una bacteria corineforme recombinante, **caracterizado porque**
 - a) se transfiere un polinucleótido aislado de acuerdo con las reivindicaciones 10 hasta 14 o de acuerdo con las reivindicaciones 14 hasta 19 a una bacteria corineforme
 - b) el gen de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa presente en el cromosoma de la bacteria corineforme, que codifica una secuencia de aminoácidos con glicina en la posición 321 y eventualmente con L-serina en la posición 8 o en una posición comparable de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2, se intercambia por el polinucleótido procedente de a), y
 - c) se multiplica la bacteria corineforme obtenida de acuerdo con las etapas a) y b).
21. Procedimiento para la producción de un microorganismo recombinante, **caracterizado porque**
 - a) se transfiere un polinucleótido aislado de acuerdo con las reivindicaciones 10 hasta 14 a un microorganismo,
 - b) el polinucleótido aislado se replica en el microorganismo, y
 - c) se multiplica el microorganismo obtenido de acuerdo con las etapas a) y b).
22. Un microorganismo recombinante, que contiene el polinucleótido aislado de acuerdo con las reivindicaciones 10 hasta 14 o 15 hasta 19.
23. Microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 22, **caracterizado porque** se trata de una bacteria corineforme o de una bacteria del género *Escherichia*.
24. Microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 23, **caracterizado porque** en el caso de la bacteria corineforme se trata del género *Corynebacterium*.
25. Microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 24, **caracterizado porque** en el caso de la bacteria del género *Corynebacterium* se trata de la especie *Corynebacterium glutamicum*.
26. Un vector, que contiene el polinucleótido aislado de acuerdo con las reivindicaciones 10 hasta 14 o 15 hasta 19.
27. Un microorganismo recombinante, que contiene el vector de acuerdo con la reivindicación 26.
28. Microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 27, **caracterizado porque** se trata de una bacteria corineforme o de una bacteria del género *Escherichia*.

29. Microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 28, **caracterizado porque** en el caso de la bacteria corineforme se trata del género *Corynebacterium*.
- 5 30. Microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 29, **caracterizado porque** en el caso de la bacteria del género *Corynebacterium* se trata de la especie *Corynebacterium glutamicum*.
31. Procedimiento para la producción de un L-aminoácido, **caracterizado porque**
- 10 a) se fermenta una bacteria corineforme aislada en un medio adecuado, conteniendo la bacteria por lo menos una copia de un gen que codifica un polipéptido con la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, estando definidas las secuencias de aminoácidos del polipéptido en las reivindicaciones 1, 6 y 7. y
- 15 b) el L-aminoácido se enriquece en el caldo de fermentación o en las células de la bacteria.
32. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 31, **caracterizado porque** en el caso de la bacteria corineforme aislada se trata de un mutante de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 9.
- 20 33. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 31, **caracterizado porque** en el caso de la bacteria corineforme aislada se trata de una bacteria corineforme recombinante, que contiene un polinucleótido aislado de acuerdo con las reivindicaciones 10 hasta 21 o que se había producido mediando utilización del mismo.
34. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 31, **caracterizado porque** se aísla o recoge el L-aminoácido.
- 25 35. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 34, **caracterizado porque** se purifica el L-aminoácido.
36. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 31, **caracterizado porque** el L-aminoácido se aísla o se recoge en común con unos componentes procedentes del caldo de fermentación y/o de la biomasa (> 0 hasta 100 %).
- 30 37. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 31, **caracterizado porque**
- a) la biomasa formada se elimina en una proporción de 0 a 100 % a partir del caldo de fermentación obtenido a partir de la etapa b) de la reivindicación 34, y
- 35 b) a partir del caldo obtenido en la etapa a) se produce un producto que está esencialmente seco y conformado, mediante un método escogido entre el conjunto que se compone de una granulación, una compactación, una desecación por atomización y una extrusión.
38. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 37, **caracterizado porque** a un caldo de fermentación que contiene L-lisina, antes o después de la etapa a) se le añade un ácido escogido entre el conjunto que se compone de ácido sulfúrico, ácido clorhídrico y ácido fosfórico.
- 40 39. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 37, **caracterizado porque** a partir del caldo obtenido antes o después de la etapa a), se elimina el agua.
- 45 40. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 37, **caracterizado porque** el producto conformado obtenido en o durante la etapa b) es rociado con un aceite.