

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 500 365**

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2005 E 05823727 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.07.2014 EP 1841859**

54 Título: **Alelos del gen m_{qo} procedente de bacterias corineformes**

30 Prioridad:

19.01.2005 DE 102005002489

12.07.2005 DE 102005032429

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

30.09.2014

73 Titular/es:

**EVONIK DEGUSSA GMBH (100.0%)
Rellinghauser Strasse 1-11
45128 Essen, DE**

72 Inventor/es:

**BATHE, BRIGITTE;
HANS, STEPHAN;
SCHISCHKA, NATALIE y
THIERBACH, GEORG**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 500 365 T3

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

DESCRIPCIÓN

Alelos del gen *mqo* procedente de bacterias corineformes

- 5 Son objeto del invento unos mutantes y alelos del gen *mqo* procedente de bacterias corineformes, que codifican unas variantes de malato-quinona oxidorreductasa (EC: 1.1.99.16) y unos procedimientos para la producción de aminoácidos, en particular de L-lisina, triptófano y L-prolina, mediando utilización de unas bacterias, que contienen estos alelos.
- 10 Estado de la técnica
- Los aminoácidos encuentran uso en la medicina humana, en la industria farmacéutica, en la industria alimentaria y en particular en la nutrición de animales.
- 15 Es conocido que ciertos aminoácidos pueden ser producidos por fermentación de unas cepas de bacterias corineformes, en particular de *Corynebacterium glutamicum*. A causa de la gran importancia de este hecho, se está trabajando constantemente en el mejoramiento de los procedimientos de producción. Unos mejoramientos de los procedimientos pueden concernir a unas medidas técnicas de fermentación tales como por ejemplo la agitación y el abastecimiento con oxígeno, o a la composición de los medios nutritivos, tal como por ejemplo la concentración de azúcares durante la fermentación, o al tratamiento para dar la forma del producto mediante por ejemplo una cromatografía con intercambio de iones, o a las propiedades intrínsecas de rendimiento del microorganismo propiamente dicho.
- 20 Para el mejoramiento de las propiedades de rendimiento de estos microorganismos se utilizan unos métodos de mutagénesis, selección y elección de mutantes. De esta manera se obtienen unas cepas, que son resistentes frente a unos antimetabolitos o que son auxótrofas para unos metabolitos importantes para regulación y que producen unos aminoácidos. Un antimetabolito conocido es el compuesto análogo a la lisina S-(2-aminoetil)-L-cisteína (AEC).
- 25 Desde hace algunos años se emplean asimismo unos métodos de la técnica de ADN recombinante para el mejoramiento de las cepas del género *Corynebacterium* que producen 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 acerca los más diferentes aspectos de la genética, del metabolismo y de la biotecnología de *Corynebacterium glutamicum* se encuentra en la cita bibliográfica de Pühler ((coordinador de edición) en *Journal of Biotechnology* 104 (1-3), 1-338, 2003.
- 30 La secuencia de nucleótidos del gen que codifica la malato-quinona oxidorreductasa de *Corynebacterium glutamicum* fue determinada por Molenaar y colaboradores (*European Journal of Biochemistry* 254 : 395 - 403 (1998) y está disponible en el Banco de Datos del National Center for Biotechnology Information (Centro nacional para información de biotecnología) (NCBI) de la National Library of Medicine (Biblioteca nacional de medicina) (Bethesda, MD, EE.UU.) bajo el número de acceso (en inglés accession number) AJ224946.
- 35 Ella puede ser deducida asimismo de la solicitud de patente internacional WO 01/00844 como la secuencia n° 569 y como la secuencia n° 571, así como de la solicitud de patente europea EP-A-1108790 como la secuencia n° 3478, la secuencia n° 7065 y como la secuencia n° 7066.
- 40 En el documento de patente europea EP1038969 se describe un mejoramiento de la producción por fermentación de L-aminoácidos por bacterias corineformes mediante el reforzamiento del gen *mqo*.
- 45 En el documento WO02086137 se describe, por el contrario, el efecto favorecedor del debilitamiento del gen *mqo* sobre la producción de L-aminoácidos por bacterias corineformes. Una mutación del gen *mqo*, descrita en la solicitud, designada como "alelo 672", lleva el nucleótido adenina en lugar del nucleótido guanina en la posición 672 de la secuencia de ADN del gen *mqo*, lo que conduce a la formación de un codón de interrupción en la posición 224 de la secuencia de aminoácidos de la malato-quinona oxidorreductasa de *Corynebacterium glutamicum*. Asimismo, se describe el "alelo 1230", que contiene, adicionalmente a la mutación en el alelo 672, todavía una transición de citosina a timina en la posición 1230 de la secuencia de nucleótidos del gen *mqo*. Además de ello, en esta solicitud se describe la desconexión del gen *mqo* mediante una interrupción del gen por medio de una mutagénesis por integración, que conduce a un aumento de la producción de L-lisina por la correspondiente cepa.
- 50 La biosíntesis microbiana de L-aminoácidos en bacterias corineformes es un complejo sistema y está enredada en múltiples capas con otras diversas rutas metabólicas en la célula. Por lo tanto, no se puede realizar ninguna predicción acerca de si una desconexión total o una disminución de la actividad catalítica de malato-quinona oxidorreductasa en diferentes etapas mejoran a la producción de L-aminoácidos. Por lo tanto, es deseable poner a disposición también unas variantes de malato-quinona oxidorreductasa, que se diferencien en el grado de su actividad.
- 55
- 60
- 65

Para conseguir una mejor claridad, la secuencia de nucleótidos del gen *mqo* (de tipo silvestre), que codifica la malato-quinona oxidorreductasa de *Corynebacterium glutamicum*, de acuerdo con los datos del banco de datos NCBI (acrónimo de National Center for Biotechnology Information = Centro nacional para información de biotecnología) se representa en la SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de la malato-quinona oxidorreductasa, que se establece a partir de aquella, se representa en las SEQ ID NO: 2 y 4. En la SEQ ID NO: 3 se indican las secuencias de nucleótidos 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 nuevas medidas técnicas para la producción mejorada por fermentación de aminoácidos, en particular de L-lisina, L-triptófano y L-prolina.

Descripción del invento

Son objeto del invento unos mutantes producidos o respectivamente aislados de bacterias corineformes, que segregan de manera preferida aminoácidos, y que contienen un gen o respectivamente un alelo, que se escoge entre uno de los siguientes a) hasta c).

- a) un gen, que codifica un polipéptido con una actividad de malato-quinona oxidorreductasa, caracterizado por que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en cuyo caso está contenida L-fenilalanina en la posición 111 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;
- b) un gen, que codifica un polipéptido con una actividad de malato-quinona oxidorreductasa, comprendiendo el polipéptido codificado una secuencia de aminoácidos que es idéntica en por lo menos un 98 % o en por lo menos un 99 % a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, estando contenida L-fenilalanina en la secuencia de aminoácidos en la posición que corresponde a la posición 111 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;
- c) un gen, que codifica una proteína con una actividad de malato-quinona oxidorreductasa, comprendiendo la proteína codificada una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 6 inclusive de uno a cinco, de manera preferida a lo sumo dos, a lo sumo tres o a lo sumo cuatro, intercambio(s) conservativo(s) de aminoácidos, estando contenida L-fenilalanina en la secuencia de aminoácidos en la posición que corresponde a la posición 111 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;

siendo aumentada la secreción de aminoácidos de estos mutantes en por lo menos un 0,5 %, en comparación con la de una cepa de partida no mutagenizada con la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2,.

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,

siendo muy especialmente preferida la especie *Corynebacterium glutamicum*.

Algunos representantes de la especie *Corynebacterium glutamicum* son conocidos en el estado de la técnica también por otras denominaciones de especies. A éstos pertenecen, por ejemplo:

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

Unos conocidos representantes de cepas de bacterias corineformes que segregan aminoácidos, son por ejemplo:

las cepas que producen L-lisina

Corynebacterium glutamicum DM58-1/pDM6 (= DSM4697)
 que se ha descrito en el documento EP 0 358 940
 Corynebacterium glutamicum MH20 (= DSM5714)
 que se ha descrito en el documento EP 0 435 132
 5 Corynebacterium glutamicum AHP-3 (= FermBP-7382)
 que se ha descrito en el documento EP 1 108 790
 Corynebacterium thermoaminogenes AJ12521 (= FERM BP3304)
 que se ha descrito en el documento de patente de los EE.UU. US 5.250.423

10 o las cepas que producen L-triptófano

Corynebacterium glutamicum K76 (=FermBP-1847)
 que se ha descrito en el documento US 5.563.052
 15 Corynebacterium glutamicum BPS13 (=FermBP-1777)
 que se ha descrito en el documento US 5.605.818
 Corynebacterium glutamicum FermBP-3055
 que se ha descrito en el documento US 5.235.940

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

25 Unas cepas con la denominación "ATCC" se pueden adquirir de la American Type Culture Collection (Colección americana de cultivos tipos) (Manassas, VA, EE.UU.). Unas 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). Unas 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 mencionadas cepas de
 30 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.

35 Por el concepto de aminoácidos proteínógenos se entienden los aminoácidos, que se presentan en proteínas naturales, es decir en proteínas de microorganismos, plantas, animales y seres humanos. A éstos pertenecen en particular unos L-aminoácidos, escogidos entre el conjunto formado por 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.

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

45 En el caso de los aminoácidos aromáticos se habla de intercambios conservativos, cuando se intercambian unos/as por otros/as fenilalanina, triptófano y tirosina. En el caso de los aminoácidos hidrófobos se habla de intercambios conservativos cuando se intercambian unas por otras leucina, isoleucina y valina. En el caso de los aminoácidos polares se habla de intercambios conservativos cuando se intercambian una por otra glutamina y asparagina. En el caso de los aminoácidos de carácter básico se habla de intercambios conservativos cuando se intercambian unas por otras arginina, lisina e histidina. En el caso de los aminoácidos de carácter ácido se habla de intercambios conservativos cuando se intercambian uno por otro el ácido aspártico y el ácido glutámico. En el caso de los
 50 aminoácidos que contienen grupos hidroxilo se habla de intercambios conservativos cuando se intercambian una por otra serina y treonina.

55 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 malato-quinona oxidoreductasa de diferentes bacterias tales como, por ejemplo, Escherichia coli, Corynebacterium glutamicum, Corynebacterium efficiens, Corynebacterium diptheriae, Mycobacterium tuberculosis, Bacillus cereus y Bacillus halodurans está contenido un motivo de secuencia que se compone de la sucesión Trp-Asn-Asn-Ala-Gly-Thr-Gly-His-Sal-Ala-Leu y también un motivo de secuencia que se compone de la sucesión Bra-Leu-Gly-Ali-Ser-Pro-Gly-Ala-Ser. La designación "Bra" representa a los aminoácidos Ile o Leu, la designación "Sal" representa a los aminoácidos Ser o Ala y la designación "Ali" representa a los
 60 aminoácidos Ala o Gly.

65 De una manera correspondiente, se prefieren aquellos mutantes de bacterias corineformes, que contienen un alelo de mgo, que codifica un polipéptido con una actividad enzimática de malato-quinona oxidoreductasa, que comprende por lo menos una secuencia de aminoácidos escogida entre el conjunto que se compone de Trp-Asn-Asn-Ala-Gly-Thr-Gly-His-Sal-Ala-Leu y Bra-Leu-Gly-Ali-Ser-Pro-Gly-Ala-Ser y que contiene L-fenilalanina en la

posición 111 o respectivamente en una posición correspondiente o comparable de la secuencia de aminoácidos. Eventualmente, la secuencia de aminoácidos contiene además de esto un intercambio de aminoácidos de L-alanina por L-serina en la posición 201 de acuerdo con la SEQ ID NO: 2.

5 El motivo de secuencia de aminoácidos Trp-Asn-Asn-Ala-Gly-Thr-Gly-His-Sal-Ala-Leu está contenido, por ejemplo en la SEQ ID NO: 6, 8 o 10 desde la posición 59 hasta la 69. El motivo de secuencia de aminoácidos Bra-Leu-Gly-Ali-Ser-Pro-Gly-Ala-Ser está contenido, por ejemplo en la SEQ ID NO: 6, 8 o 10 desde la posición 433 hasta la 441.

10 Finalmente, son objeto del invento unos mutantes de bacterias corineformes, que contienen un alelo de m_{qo}, que codifica un polipéptido con una actividad enzimática de malato-quinona oxidoreductasa, que abarca la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

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.

15 Por el concepto de "una posición correspondiente a la posición 111 de la secuencia de aminoácidos" o de "una posición comparable a la posición 111 de la secuencia de aminoácidos" se entiende el hecho de que mediante una inserción o supresión de un codón que codifica un aminoácido en la región terminal de N (referida a la posición 111 de la SEQ ID NO: 6) 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 TCA, que codifica el aminoácido L-serina, en la posición 2 de la SEQ ID NO:5, la L-fenilalanina se desplaza desde la posición 111 hasta la posición 110. El dato sobre la longitud sería entonces: 499 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 111) 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 10 %, como máximo en un 7,5 %, como máximo en un 5 %, como máximo en un 2,5 % o como máximo en un 1 % de la actividad del polipéptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

35 Para la producción de los mutantes conformes al invento se pueden utilizar procedimientos clásicos de mutagénesis in vivo con unas poblaciones celulares de bacterias corineformes mediando utilización de sustancias mutágenas tales como, por ejemplo, la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) 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 Tosaka y colaboradores (Agricultural and Biological Chemistry 42 (4), 745-752 (1978), o en la cita de Konicek y colaboradores (Folia Microbiologica 33, 337-343 (1988)). Unas mutagénesis típicas mediando utilización de MNNG comprenden unas concentraciones de 50 a 500 mg/l o también unas concentraciones más altas de hasta como 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 % hasta 90 % o de aproximadamente 50 % hasta 99 % o de aproximadamente 50 % hasta 99,9 % o más.

45 A partir de la población celular mutagenizada se sacan y multiplican mutantes o respectivamente células. En otra etapa, las células son disgregadas mediando toma de ayuda de un Ribolyser (de Hybaid, Heidelberg, Alemania) y la actividad intracelular de malato-quinona oxidoreductasa se determina, por ejemplo, según el método de Molenaar y colaboradores (European Journal of Biochemistry 254 : 395-403 (1998)). De esta manera se identifican unos mutantes, cuya actividad intracelular de malato-quinona oxidoreductasa ha disminuido en por lo menos un 30 %, de manera preferida en por lo menos un 35 % y de manera especialmente preferida en por lo menos un 40 % en comparación con la cepa de partida no mutagenizada. A continuación, se investiga su capacidad para segregar aminoácidos, de manera preferida L-lisina, L-triptófano o L-prolina, en un cultivo por tandas (en inglés "batch") mediando utilización de un medio nutritivo adecuado. Unos adecuados medios nutritivos y unas adecuadas condiciones de ensayo se describen, entre otros, en los documentos US 6.221.636, US 5.840.551, US 5.770.409, US 5.605.818, US 5.275.940 y US 4.224.409. En los casos de utilizaciones de unas instalaciones robóticas apropiadas, tales como las que se describen por ejemplo en la cita de Zimmermann y colaboradores (VDI Berichte n° 1.841, editorial VDI, Düsseldorf, Alemania 2004, 439-443) o en la de Zimmermann (Chemie Ingenieur Technik 77 (4), 426-428 (2005)), se pueden investigar numerosos mutantes en un breve período de tiempo. De esta manera se identifican unos mutantes que poseen una actividad disminuida de malato-quinona oxidoreductasa y que en comparación con la cepa parental o respectivamente con la cepa de partida no mutagenizada, segregan aminoácidos de manera multiplicada en el medio nutritivo o en el interior de las células. A éstos pertenecen, por ejemplo, unos mutantes cuya secreción de aminoácidos se ha aumentado por lo menos en un 0,5 %.

65 A continuación, a partir de los mutantes se pone a disposición o respectivamente se aísla un ADN, y con ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa mediando utilización de unos pares de cebadores, que permiten la

amplificación del gen m_{qo} o respectivamente del alelo de m_{qo} conforme al invento, o de la mutación conforme al invento en la posición 111 de la secuencia de aminoácidos, 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 forma aumentada.

5 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 que es 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 679 de la SEQ ID NO: 3. El correspondiente segundo cebador 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 2.002 y 953 de la SEQ ID NO:3. Si se desea la amplificación de la región codificadora, entonces el par de cebadores se escoge de manera preferida a partir de la secuencia de nucleótidos que se encuentra entre las posiciones 1 y 349 de la SEQ ID NO:3 y a partir de la secuencia complementaria de nucleótidos situada entre las posiciones 2.002 y 1.850 de la SEQ ID NO:3. 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: 15, 17 y 19, entonces el par de cebadores se escoge de manera preferida a partir de la secuencia de nucleótidos que se encuentra entre las posiciones 351 y 679 de la SEQ ID NO:3, y a partir de la secuencia complementaria de nucleótidos que se encuentra entre las posiciones 1.848 y 953 de la SEQ ID NO: 3.

Unos adecuados pares de cebadores son, por ejemplo, el par de cebadores m_{qo}-Start y m_{qo}-Stop que se reproduce bajo la SEQ ID NO: 11 y la SEQ ID NO: 12, o el par de cebadores m_{qo}-A1 y m_{qo}-E1 que se reproduce bajo la SEQ ID NO: 13 y la SEQ ID NO: 14.

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.

30 Para la producción de polinucleótidos mediante amplificación de unas secuencias escogidas, tales como las del alelo de m_{qo} conforme al invento, a partir de un ADN dispuesto previamente, por ejemplo cromosomal, mediante amplificación por medio de una PCR, se emplean por lo general unas polimerasas de ADN termoestables. Unos 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 procedente 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 actividad de "lectura de comprobación" significa que estas polimerasas están en la situación de reconocer a unos nucleótidos que han sido introducidos erróneamente y de solventar los errores mediante una polimerización renovada (Lottspeich y Zorbas, *Bioanalytik*, editorial Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Alemania (1998)). Unos ejemplos de polimerasas con una actividad de lectura de comprobación son la polimerasa Vent y la polimerasa Pfu.

45 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 él no esté contenido en el tampón suministrado por el fabricante. A la tanda de reacción se le añaden además desoxinucleósido-trifosfatos en una concentración de 0,1 - 16,6 mM. Los cebadores se disponen previamente en la tanda de reacción con una concentración final de 0,1 - 3 μ M y el ADN de molde, en el caso óptimo, con 10^2 hasta 10^5 copias. También se pueden emplear desde 10^6 hasta 10^7 copias. La correspondiente polimerasa se añade a la tanda de reacción en una cantidad de 2-5 unidades. Una típica tanda de reacción tiene un volumen de 20 - 100 μ l.

55 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).

60 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 (extensión) del cebador dispuesto previamente 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 la 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; los conceptos de fragmento de ácido nucleico y de molécula de ácido nucleico son asimismo habituales.

5
10
15
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).

20
25
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 que ha sido 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).

30
De esta manera se identifican unos mutantes, cuyos alelos de mco codifican unos polipéptidos con una actividad enzimática de malato-quinona oxidoreductasa que en la posición contienen cualquier aminoácido proteinógeno exceptuando la L-serina. Se prefiere el intercambio por L-fenilalanina o L-alanina. Eventualmente, la secuencia de aminoácidos contiene, además de ello, un intercambio de aminoácidos de L-alanina por otro aminoácido proteinógeno, de manera preferida L-serina, en la posición 201 o respectivamente en la posición correspondiente o comparable.

35
Unos mutantes conformes al invento de una bacteria corineforme son obtenibles, por lo tanto, mediante las siguientes etapas:

- 40
45
50
55
60
65
- a) un tratamiento de una bacteria corineforme, que posee la capacidad de segregar aminoácidos, con un agente mutágeno,
 - b) un aislamiento y una multiplicación del mutante producido en a)
 - c) una determinación de la capacidad del mutante en un medio para segregar por lo menos un 0,5 % más del aminoácido o para enriquecerlo en el interior de una célula en comparación con la bacteria corineforme empleada en a),
 - d) una puesta a disposición de un ácido nucleico procedente del mutante obtenido en b),
 - e) una producción de una molécula de ácido nucleico mediante utilización de la reacción en cadena de la polimerasa, del ácido nucleico procedente de d), y de un par de cebadores que se compone de un primer cebador que comprende por lo menos 15 nucleótidos consecutivos escogidos a partir de la secuencia de nucleótidos que se encuentra entre las posiciones 1 y 394 de la SEQ ID NO: 3, 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 2.002 y 1.850 de la SEQ ID NO: 3.
 - f) una determinación de la secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico obtenida en e), y una determinación de la secuencia de aminoácidos codificada.
 - g) eventualmente, una comparación de la secuencia de aminoácidos determinada en f) con la SEQ ID NO: 6, y
 - h) una identificación de un mutante, que contiene un polinucleótido, que codifica un polipéptido, que en la posición 111 o en una posición comparable contiene L-fenilalanina, y eventualmente en la posición 201 o en una posición comparable contiene L-serina.

Los mutantes producidos de este modo contienen típicamente una (1) copia del alelo de gnd descrito.

- En la SEQ ID NO: 5 se reproducen a modo de ejemplo las regiones codificadoras de los alelos de m_{qo} 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 332 la nucleobase citosina, en la posición 331 la nucleobase timina y en la posición 601 la nucleobase guanina. La SEQ ID NO: 1 contiene en las posiciones 331 hasta 333 el codón TCT que codifica el aminoácido L-serina y en las posiciones 601 hasta 603 el codón GCT que codifica el aminoácido L-alanina. La SEQ ID NO: 5 contiene en la posición 332 la nucleobase timina. Mediante esta transición de citosina a timina resulta en las posiciones 331 hasta 333 el codón TTT que codifica el aminoácido L-fenilalanina. Por medio de una transversión de guanina a timina resulta en las posiciones 601 hasta 603 el codón TCT que codifica el aminoácido L-serina. Además de esto, la secuencia de nucleótidos representada en la SEQ ID NO: 5 puede 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.
- 15 Las bacterias corineformes utilizadas para la mutagénesis ya poseen de manera preferida la capacidad de segregar el aminoácido deseado en el medio nutritivo, o respectivamente en el caldo de fermentación, que las rodea, o de enriquecerlo en el interior de las células.
- 20 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 unas mezclas de lisina y treonina o por unas 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}.
- 25 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.
- 30

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	

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

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), $lysC$ S317A (intercambio de serina en la posición 317 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 22 por alanina) y $lysC$ T380I (intercambio de treonina en la posición 380 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 22 por isoleucina).

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) 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).

5 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.

10 Según el modo que se ha descrito más arriba, partiendo de la cepa DM1797, se aísla un mutante designado como DM1808, que contiene un alelo de mqo , que codifica un polipéptido, en el que está contenida L-fenilalanina en la posición 111 de la secuencia de aminoácidos. La secuencia de nucleótidos del alelo de mqo del mutante DM1808 se representa como la SEQ ID NO: 5 y la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado se representa como la SEQ ID NO: 6.

15 De igual manera se encontró un mutante, que contiene un alelo de mqo , que codifica un polipéptido en cuyo caso está contenida L-alanina en la posición 111 de la secuencia de aminoácidos y en cuyo caso está contenida L-serina en la posición 201 de la secuencia de aminoácidos. La secuencia de nucleótidos del alelo de mqo de este mutante se representa como la SEQ ID NO: 9 y la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado se representa como la SEQ ID NO: 10.

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

25 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-fluoro-triptófano (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.

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

35 Es un objeto del invento asimismo un polinucleótido aislado, que se escoge entre el conjunto formado por las siguientes etapas a) o b)

40 a) un polinucleótido, que codifica un polipéptido con una actividad enzimática de malato-quinona oxidorreductasa y que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, el cual posee L-fenilalanina en la posición 111 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y eventualmente L-serina en la posición 201 de la SEQ ID NO: 2,

45 b) un polinucleótido, que codifica un polipéptido con una actividad enzimática de malato-quinona oxidorreductasa, abarcando el polipéptido codificado una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 6 inclusive de uno a cinco, de manera preferida a lo sumo dos, a lo sumo tres o a lo sumo cuatro intercambio(s) conservativo(s) de aminoácidos, estando contenida L-fenilalanina en la secuencia de aminoácidos en la posición que corresponde a la posición 111 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

50 aumentando estos polinucleótidos en por lo menos un 0,5 % en peso la secreción de aminoácidos de unos correspondientes mutantes, en comparación con la cepa de partida no mutagenizada con la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2.

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

60 Por lo demás, para la mutagénesis del gen mqo se pueden emplear ciertos métodos in vitro. En el caso de la utilización de los métodos in vitro, unos polinucleótidos aislados, que contienen un gen mqo 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.

65 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 mqo , 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; los conceptos de "molécula de ácido nucleico" o "fragmento de ácido nucleico" son asimismo habituales. Unas instrucciones para realizar la amplificación de las 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 m_{qo} 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.).

Otras instrucciones y recopilaciones 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 sobre genética y biología molecular que se conocen, tales como p.ej. 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 polinucleótido aislado conforme al invento, que codifica un polipéptido con una actividad enzimática de malato-quinona oxidoreductasa, comprende de manera preferida una secuencia de aminoácidos con una longitud de 500 aminoácidos, estando contenida L-fenilalanina en la posición 111.

Un objeto del invento es por lo demás un polinucleótido aislado, que codifica un polipéptido con una actividad enzimática de malato-quinona oxidoreductasa, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

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

Un objeto del invento es por lo demás un polinucleótido, que contiene la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 5.

Un objeto del invento es, además de esto, un polinucleótido aislado, que comprende una molécula de ácido nucleico o un fragmento de ADN, que codifica por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 95 hasta 127 de la SEQ ID NO: 2, o que codifica por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 79 hasta 144 de la SEQ ID NO: 2, o que codifica por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 62 hasta 160 von SEQ ID NO: 2, o que codifica por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 45 hasta 177 de SEQ ID NO: 2, o que codifica por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 27 hasta 194 de la SEQ ID NO: 2, o que codifica por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 11 hasta 211 de la SEQ ID NO: 2, o que codifica por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente 2 hasta 250 de la SEQ ID NO: 2, o que codifica por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 2 hasta 375 de la SEQ ID NO: 2, o que codifica por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 2 hasta 495 de la SEQ ID NO: 2, estando contenida L-fenilalanina en la posición correspondiente a la posición 111 de la SEQ ID NO: 2, y estando contenida eventualmente L-serina en la posición correspondiente a la posición 201 de la SEQ ID NO: 2, para la utilización en la producción de bacterias corineformes, que tienen una secreción aumentada en por lo menos un 0,5 % en comparación con la cepa de partida no mutagenizada con la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2.

Un ejemplo de un marco de lectura conforme al invento que comprende un polinucleótido, que codifica por lo menos la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 95 hasta 127 correspondientes a la SEQ ID NO: 2, estando contenida L-fenilalanina (Xaa representa la L-fenilalanina) en la posición correspondiente a la posición 111 de la secuencia de aminoácidos, se expone seguidamente:

```
cag gtt tcc cgt cag ttc tgg tct cac ctc gtt gaa gag gga gtg ctg nnn
Gln Val Ser Arg Gln Phe Trp Ser His Leu Val Glu Glu Gly Val Leu Xaa
95                               100                               105                               110
```

```
gat cct aag gaa ttc atc aac cct gtt cct cac gta tct ttc ggc cag
Asp Pro Lys Glu Phe Ile Asn Pro Val Pro His Val Ser Phe Gly Gln
115                               120                               125
```

Asimismo él se representa como la SEQ ID NO: 15. La secuencia de aminoácidos codificada por este marco de lectura se representa como la SEQ ID NO: 16, representando Xaa L-fenilalanina.

- 5 Se prefieren unas moléculas de ácidos nucleicos, que codifican por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 95 hasta 127 de la SEQ ID NO: 6 o por lo menos correspondiente a las posiciones 79 hasta 144 de la SEQ ID NO: 6 o por lo menos correspondiente a las posiciones 62 hasta 160 de la SEQ ID NO: 6 o por lo menos correspondiente a las posiciones 45 hasta 177 de la SEQ ID NO: 6 o por lo menos correspondiente a las posiciones 27 hasta 194 de la SEQ ID NO: 6 o por lo menos correspondiente a las posiciones 11 hasta 211 de la SEQ ID NO: 6 o por lo menos correspondiente a las posiciones 2 hasta 250 de la SEQ ID NO: 6 o por lo menos correspondiente a las posiciones 2 hasta 375 de la SEQ ID NO: 6 o por lo menos correspondiente a las posiciones 2 hasta 495 de la SEQ ID NO: 6.

- 15 Un ejemplo de un marco de lectura conforme al invento que comprende un polinucleótido, que codifica por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 95 hasta 127 de la SEQ ID NO: 6, se expone a continuación:

```
cag gtt tcc cgt cag ttc tgg tct cac ctc gtt gaa gag gga gtg ctg ttt
Gln Val Ser Arg Gln Phe Trp Ser His Leu Val Glu Glu Gly Val Leu Phe
95                               100                               105                               110
```

```
gat cct aag gaa ttc atc aac cct gtt cct cac gta tct ttc ggc cag
Asp Pro Lys Glu Phe Ile Asn Pro Val Pro His Val Ser Phe Gly Gln
115                               120                               125
```

- 20 Asimismo el marco de lectura se representa como la SEQ ID NO: 17. La SEQ ID NO: 18 muestra la secuencia de aminoácidos codificada por este marco de lectura.

- 25 Se prefieren muy especialmente unas moléculas de ácidos nucleicos, que comprenden por lo menos una secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 283 hasta 381 de la SEQ ID NO:5 o por lo menos una secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 235 hasta 432 de la SEQ ID NO:5 o por lo menos una secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 184 hasta 480 de la SEQ ID NO:5 o por lo menos una secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 133 hasta 531 de la SEQ ID NO:5 o por lo menos una secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 85 hasta 582 de la SEQ ID NO:5 o por lo menos una secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 28 hasta 630 de la SEQ ID NO:5 o por lo menos una secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 4 hasta 753 de la SEQ ID NO:5 o por lo menos una secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 4 hasta 1.125 de la SEQ ID NO:5 o por lo menos una secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 4 hasta 1.485 de la SEQ ID NO:5.

- 35 Los polinucleótidos aislados conformes al invento se pueden utilizar 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.

- 40 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 que interesa, 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.

- 45 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) 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 comprende toda la región codificadora, tal como se expone por ejemplo en la SEQ ID NO:5, o que comprende 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 95 hasta 127 de la SEQ ID NO: 6, y que se representan como las SEQ ID NO: 15 y 17. La parte de la región codificadora correspondiente a las SEQ ID NO: 15 y 17 tiene una longitud de 99 nucleobases. Se prefieren aquellas partes de la región codificadora cuya longitud es de ≥ 195 nucleobases, tales como, por ejemplo, unas moléculas de ácidos nucleicos, que codifican por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 79 hasta 144 de la SEQ ID NO: 6. Se prefieren muy especialmente aquellas partes de la región codificadora, cuya longitud es de ≥ 295 nucleobases, tales como por ejemplo unas moléculas de ácidos nucleicos, que codifican por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 62 hasta 160 de la SEQ ID NO: 6.

El fragmento de ADN, que contiene la mutación que interesa, se presenta, en el caso de este método, típicamente dentro de un vector, en particular 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*.

Unos ejemplos de tales vectores de plásmidos son los vectores pK**mob* y pK**mobsacB*, tales como, por ejemplo el pK18*mobsacB*, que han sido descritos por Schäfer y colaboradores (Gene 145, 69-73 (1994)) y los vectores que han sido 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 sucrasa) de, por ejemplo, *Bacillus*, o el gen *galK* (gen de la galactosa cinasa) de, por ejemplo, *Escherichia coli*. (Por el concepto de "un gen, que actúa de un modo dominante negativo condicional" se entiende un gen, que en determinadas condiciones es desventajoso, por ejemplo tóxico, para el anfitrión, pero que en otras condiciones no tiene repercusiones negativas sobre el anfitrión que lleva el gen). Éstos hacen posible la selección en cuanto a unos sucesos de recombinación, en cuyos casos el vector es eliminado desde el cromosoma. Por lo demás, por Nakamura y colaboradores (documento US-A-6.303.383) se describió un plásmido sensible frente a la temperatura para bacterias corineformes, que solamente se puede replicar a unas temperaturas situadas por debajo de 31°C.

El vector es transferido a continuación a la bacteria corineforme mediante conjugación, por ejemplo según el método de Schäfer (Journal of Bacteriology 172, 1663-1666 (1990)) o mediante transformación, por ejemplo según el método de Dunican y Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) o según el método de Thierbach y colaboradores (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)). 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 bórnon 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.

Otro objeto 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 malato-quinona oxidoreductasa que está presente en el cromosoma de la bacteria corineforme, que codifica una secuencia de aminoácidos con L-serina en la posición 111 o en una posición comparable de la secuencia de aminoácidos, se intercambia por el polinucleótido procedente de a), que codifica una secuencia de aminoácidos, que posee en la posición 111 o en una posición comparable de la secuencia de aminoácidos otro L-aminoácido, de manera preferida L-fenilalanina o L-alanina, y eventualmente en la posición 201 cualquier aminoácido proteinógeno exceptuando la L-alanina, de manera preferida el aminoácido L-serina, y

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

5 De esta manera se obtiene una bacteria corineforme recombinante que, en lugar del gen m_{qo} de tipo silvestre, contiene un alelo de m_{qo} conforme al invento.

10 Otros objetos del invento son, de modo correspondiente, unos anfitriones o respectivamente unas células anfitrionas, de manera preferida unos microorganismos, de manera especialmente preferida unas bacterias corineformes y unas bacterias del género *Escherichia*, que contienen los polinucleótidos conformes al invento. De igual manera, son objeto del invento unos microorganismos, que se habían producido mediando 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.

15 Los polinucleótidos aislados conformes al invento se pueden utilizar asimismo para la consecución de una sobreexpresión de las/los proteínas/polipéptidos codificadas/os por ellos.

20 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 m_{qo} o respectivamente unos polinucleótidos, que codifican unas malato-quinona oxidorreductasas, que en la posición 111 de la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado contienen cualquier aminoácido proteinógeno exceptuando la L-serina, siendo preferido el intercambio por L-fenilalanina o por L-alanina. Eventualmente, la proteína codificada contiene además de ello un intercambio de L-alanina por otro aminoácido proteinógeno, de manera preferida L-serina, en la posición 201 de la secuencia de aminoácidos.

25 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.

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

35 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 que han sido descritos por Tauch y colaboradores (*Journal of Biotechnology* 99, 79-91 (2002)). Un artículo recopilativo sobre el tema de los plásmidos en *Corynebacterium glutamicum* se encuentra en la cita de Tauch y colaboradores (*Journal of Biotechnology* 104, 27-40 (2003)).

40 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 que interesa se introduce en el cromosoma de una bacteria corineforme.

45 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) para el operón hom-thrB, un plásmido, que no es replicativo en *C. glutamicum*, el cual contiene el gen que interesa, 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.

50 En otra forma de realización, que se describe en los documentos WO 03/040373 y de solicitud de patente de los EE.UU. US-2003-0219881-A1, una o varias copia(s) del gen que interesa 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*.

55 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 que interesa, de manera preferida en una disposición en tándem con respecto al gen o alelo que ya está 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.

60 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)). Por lo demás, 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 m_{qo} conforme al invento, típicamente a una distancia de aproximadamente 1 - 500 nucleótidos desde el codón de iniciación, de una bacteria corineforme recombinante, que en lugar del aminoácido L-serina, que está presente de modo natural en la posición 111, contiene otro aminoácido proteínógeno. Un tal promotor se puede introducir naturalmente asimismo corriente arriba del alelo de m_{qo} de un mutante conforme al invento. Por lo demás, es posible unir con un promotor a un polinucleótido que ha sido aislado conforme al invento, que codifica una variante conforme al invento de la malato-quinona oxidoreductasa, 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. Por medio de unas medidas técnicas para la prolongación de la duración de vida del ARNm (ARN mensajero) se mejora asimismo la expresión. Por lo demás, mediante una evitación de la degradación de la proteína enzimática se puede reforzar asimismo la actividad enzimática. Alternativamente, se puede conseguir por lo demás una sobreexpresión del correspondiente gen o alelo mediante una modificación de la composición de los medios y de la realización del cultivo.

Mediante las medidas técnicas de sobreexpresión se aumenta la actividad o concentración de la correspondiente proteína por lo general en por lo menos 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 a la 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 malato-quinona oxidoreductasa se describe en la cita de Molenaar y colaboradores (Journal of Bacteriology 182(24), 6884-6891 (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 borrón Western con un anticuerpo específico para la proteína que se ha de detectar (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 111: 2630-2647 (1999)).

De modo correspondiente, son objeto del invento unos procedimientos para la sobreexpresión de las malato-quinona oxidoreductasas 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 malato-quinona oxidoreductasa, en la que está contenida L-fenilalanina en la posición 111 o en la correspondiente posición de la secuencia de aminoácidos codificada, en por lo menos una (1) o varias copia(s). Otro procedimiento conforme al invento consiste en que se use un promotor funcionalmente con el polinucleótido.

Son objeto del invento por lo demás unos microorganismos, que tienen en el interior de sus células una concentración, o una actividad, aumentada de las variantes conformes al invento de la malato-quinona oxidoreductasa.

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 glicólisis, 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 unos 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*, que se ha descrito en el documento EP 0 197 335,

- un gen zwf, que codifica una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, tal como por ejemplo el gen zwf del tipo silvestre de *Corynebacterium glutamicum*, que se ha descrito en el documento de solicitud de patente japonesa JP-A-09224661 y en el de solicitud de patente europea EP-A-1108790,
- 5 • los alelos de zwf de *Corynebacterium glutamicum*, que se han descrito en el documento US-2003-0175911-A1, que codifican una proteína, en la que, por ejemplo, la L-alanina ha sido reemplazada por L-treonina en la posición 243 de la secuencia de aminoácidos, o en la que el L-acido aspártico ha sido reemplazado por L-serina en la posición 245,
- 10 • un gen pyc, que codifica una piruvato carboxilasa, tal como, por ejemplo, el gen pyc de tipo silvestre de *Corynebacterium glutamicum*, que se ha descrito en el documento de solicitud de patente alemana DE-A-198 31609 y en el documento EP 1108790,
- 15 • el alelo de pyc de *Corynebacterium glutamicum*, que se ha descrito en el documento EP 1 108 790, que codifica una proteína, en la que la L-prolina ha sido reemplazada por L-serina en la posición 458 de la secuencia de aminoácidos,
- los alelos de pyc de *Corynebacterium glutamicum*, que se han descrito en el documento WO 02/31158, que codifican 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 reemplazado por L-acido aspártico en la posición 153, de L-alanina reemplazada por L-serina en la posición 182, de L-alanina reemplazada por L-serina en la posición 206, de L-histidina reemplazada por L-arginina en la posición 227, de L-alanina reemplazada por glicina en la posición 452 y de L-acido aspártico reemplazado por L-acido glutámico en la posición 1.120 (la Figura 2A del documento WO 02/31158 indica dos diferentes posiciones de iniciación para la piruvato carboxilasa, que se diferencian por 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 situada en el extremo terminal de N),
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40 • un gen lysC que codifica una aspartato cinasa, tal como por ejemplo el gen lysC del tipo silvestre de *Corynebacterium glutamicum*, que se ha descrito como la SEQ ID NO: 281 en el documento EP-A-1108790 (véanse también los números de acceso AX120085 y 120365) y que se ha descrito como la SEQ ID NO: 25 en el documento WO 01/00843 (véase el número de acceso AX063743),
- 45 • 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*, que se ha descrito en el documento DE-A-195 48 222,
- 50 • el gen zwa1 del tipo silvestre de *Corynebacterium glutamicum* que codifica la proteína Zwa1 (documento US 6.632.644).

55 Por lo demás, para la producción de L-lisina puede ser ventajoso, junto a la utilización de los alelos del gen mqo conformes al invento, debilitar o desconectar simultáneamente uno o varios de los 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*, que se ha descrito en los documentos US 6.586.214 y US 6.465.238,
- 60 • un gen hom que codifica la homoserina deshidrogenasa, tal como, por ejemplo, el gen hom de *Corynebacterium glutamicum*, que se ha descrito en el documento EP-A-0131171,
- un gen thrB que codifica la homoserina cinasa, tal como, por ejemplo, el gen thrB de *Corynebacterium glutamicum*, que ha sido descrito por Peoples y colaboradores (*Molecular Microbiology* 2 (1988): 63 - 72)) y
- 65

- un gen pfk que codifica la fosfofructocinasa, tal como, por ejemplo, el gen pfkB de *Corynebacterium glutamicum* que se ha descrito en el documento WO 01/00844 (secuencia n° 57).

5 Las medidas técnicas de debilitamiento que se exponen se pueden combinar eventualmente con las adicionales medidas técnicas de sobreexpresión (sobreexpresión del gen *dapA*, del gen *zwf*, etc.) que se exponen.

10 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 al correspondiente gen o a la correspondiente enzima (proteína), y eventualmente se combinan estas medidas técnicas.

15 Mediante las medidas técnicas del debilitamiento se reduce la actividad o concentración de la correspondiente proteína por lo general a 0 hasta 75 %, a 0 hasta 50 %, a 0 hasta 25 %, a 0 hasta 10 % o a 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.

20 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, que es 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, la capacidad de funcionar o respectivamente la actividad de la proteína se perjudica 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 conduce 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 conducen a unas mutaciones por desplazamiento del marco de lectura (en inglés "frame shift mutations"), que conducen 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 conduce asimismo a una interrupción prematura de la traducción. Unas supresiones de por lo menos (1) o varios codones conducen típicamente asimismo a una pérdida total de la actividad enzimática.

35 Unas instrucciones para la producción de tales mutaciones pertenecen al estado de la técnica y se pueden deducir de los libros de texto conocidos acerca 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.

45 Las bacterias corineformes aisladas, que se han obtenido por medio de las medidas técnicas 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.

50 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 *mqo*, que codifica una malatoquinona oxidorreductasa, que contiene el intercambio de aminoácidos que se ha descrito en la posición 111 de la secuencia de aminoácidos y eventualmente un intercambio de aminoácidos de L-alanina por otro aminoácido proteinógeno, de manera preferida L-serina, en la posición 201.

55 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 que se escogen 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.

60 Las bacterias corineformes aisladas, conformes al invento, se pueden cultivar continuamente - tal como se ha que 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 de cultivación conocidos 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

periphäre 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 unos azúcares y unos hidratos de carbono, tales como p.ej. glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melazas, unas soluciones que contienen sacarosa procedentes de la producción de remolacha azucarera o de caña de azúcar, unos almidones, unos materiales hidrolizados de almidones y unas celulosas, unos aceites y unas grasas, tales como por ejemplo aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y grasa de coco, unos ácidos grasos, tales como por ejemplo ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, unos alcoholes, tales como por ejemplo glicerol, metanol y etanol, y unos 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 unos 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 unos 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 por lo demás unas sales, por ejemplo en forma de cloruros o sulfatos, de unos metales, tales como por ejemplo sodio, potasio, magnesio, calcio y hierro, tales como por ejemplo sulfato de magnesio o sulfato de hierro, que son necesarias para el crecimiento. Finalmente, de manera adicional a las sustancias arriba mencionadas se pueden emplear unas sustancias de crecimiento esenciales, tales como aminoácidos, por ejemplo homoserina, y unas vitaminas, por ejemplo tiamina, biotina o ácido pantoténico. Al medio de cultivo se le pueden añadir además de ello unos adecuados compuestos precursores de los respectivos aminoácidos.

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 unos compuestos de carácter básico, tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco o respectivamente agua amoniacal, o unos 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 unos 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, tales como por ejemplo unos antibióticos. Con el fin de mantener unas condiciones aerobias, se introducen en el cultivo oxígeno o mezclas gaseosas que contienen oxígeno, tales como por ejemplo aire. La utilización de unos líquidos, que están enriquecidos con peróxido de hidrógeno, es asimismo posible. Eventualmente, la fermentación se realiza a sobrepresión, por ejemplo a una presión de 0,03 a 0,2 MPa. La temperatura del cultivo está situada normalmente en 20°C hasta 45°C y de manera preferida en 25°C hasta 40 °C. En el caso de los procedimientos de cultivación por tandas, se continúa realizando la cultivación hasta que se haya formado una cantidad máxima del deseado aminoácido. Este objetivo se alcanza normalmente en el transcurso de 10 horas hasta 160 horas. En el caso de los procedimientos continuos son posibles unos más largos períodos de tiempo de cultivación.

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

Unos métodos para la determinación de L-aminoácidos se conocen a partir del estado de la técnica. El análisis se puede efectuar, por ejemplo, tal como se ha descrito en la cita de Spackman y colaboradores (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1.190) mediante una cromatografía de gases con intercambio de aniones con una subsiguiente derivatización con ninhidrina, o él se puede efectuar mediante una HPLC (cromatografía de fase líquida de alto rendimiento) de fase inversa (en inglés "reversed phase HPLC"), tal como se ha descrito en la cita de Lindroth y colaboradores (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174).

Un objeto del invento es, de modo correspondiente, también un procedimiento para la producción de un L-aminoácido, en cuyo caso

- a) se fermenta una bacteria corinefome aislada en un medio adecuado, conteniendo la bacteria un gen conforme al invento, que codifica un polipéptido con una actividad enzimática de malato-quinona oxidoreductasa, siendo reemplazada, en las secuencias de aminoácidos del polipéptido, la L-serina por L-fenilalanina en la posición 111 o en la posición correspondiente, y siendo reemplazada eventualmente la L-alanina por otro aminoácido proteinógeno, de manera preferida L-serina en la posición 201 o en la posición correspondiente, y
- b) el L-aminoácido se enriquece en el caldo de fermentación o en las células de la bacteria corinefome aislada.

El caldo de fermentación producido de esta manera se transforma a continuación en 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 temperatura determinada. El medio de fermentación o respectivamente los medios empleados durante la fermentación contiene(n) todas las sustancias o respectivamente todos los componentes, que aseguran una multiplicación o reproducción 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 o reproducción de las células del microorganismo, b) el aminoácido deseado que se ha formado en el transcurso de la fermentación, c) los productos secundarios orgánicos que se han formado en el transcurso de la fermentación y d) los componentes no consumidos por la fermentación del medio de fermentación o de los medios de fermentación que se emplea(n) o respectivamente de las sustancias empleadas de partida, tales como, por ejemplo, unas vitaminas tales como biotina, unos aminoácidos tales como homoserina o unas 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 eventualmente junto con el respectivo L-aminoácido deseado y que son segregadas eventualmente. Entre éstos 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, pertenecen a éstos también unos azúcares tales como, por ejemplo, trehalosa.

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

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

Un conjunto de productos que contienen L-lisina comprende unas soluciones acuosas concentradas, de carácter alcalino, de L-lisina purificada (documento de patente europea EP-B-0534865). Otro conjunto, tal como el que se ha descrito por ejemplo en los documentos US 6.340.486 y US 6.465.025, comprende 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 comprende unas formas pulverulentas o cristalinas de L-lisina purificada o respectivamente pura, que se presenta típicamente en forma de una sal tal como, por ejemplo, el monohidrocloreto de L-lisina. Otro conjunto de formas 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 %.

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

Para la producción de L-aminoácidos puros, sólidos, se 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 monohidrocloreto de lisina (Lys-HCl) o el sulfato de lisina (Lys₂-H₂SO₄).

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

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

Según sea el requisito, la biomasa se puede eliminar total o parcialmente a partir del caldo de fermentación, mediante unos métodos de separación tales como p.ej. los de la centrifugación, de la filtración, de la decantación o una combinación de éstos, o se puede dejar completamente dentro de 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 la adición de un ácido.

Los componentes químicos de la biomasa son, entre otros, la envoltura de las células, por ejemplo el peptidoglicano y el arabinogalactano, la proteína o respectivamente el polipéptido, por ejemplo el polipéptido de malato-quinona oxidoreductasa, unos lípidos y fosfolípidos y unos 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 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.

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 20 %, 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 solamente en pequeñas proporciones, de tal manera que permanece en el producto producido la totalidad (el 100 %) o más de un 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 99,9 % de la biomasa. En un procedimiento conforme al invento, se elimina de modo correspondiente la biomasa en unas proporciones de ≥ 0 % hasta ≤ 100 %.

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

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 % y de manera muy especialmente preferida por lo menos en un 75 %. Eventualmente, éstos 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.

A continuación, al caldo se le substraen 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 el caldo es espesado o concentrado. Este caldo de fermentación aumentado de concentración se puede elaborar seguidamente mediante unos métodos de liofilización, desecación por atomización, granulación por atomización o mediante procedimientos de otros tipos, tal como, por ejemplo, en la capa turbulenta 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 fino.

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 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 .

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.

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

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

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

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

25 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 unos caldos de fermentación, que está caracterizado por las etapas de

a) 30 cultivación y fermentación de una bacteria corineforme que segrega un L-aminoácido conforme al invento, que contiene por lo menos un alelo de m_{qo}, que codifica un polipéptido con una actividad de malato-quinona oxidoreductasa, que comprende una secuencia de aminoácidos, en la que está contenida L-fenilalanina en la posición 111 o en la posición comparable, y estando contenida eventualmente L-serina en la posición 201 o en la posición comparable, en un medio de fermentación,

b) 35 eliminación de la biomasa que se ha formado durante la fermentación, en una proporción de 0 a 100 % en peso, y

c) 40 desecación del caldo de fermentación que se ha 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).

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

50 Además, es ventajoso 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 unas mezclas de aceites vegetales. Unos ejemplos de tales aceites son aceite de soja, aceite de oliva, y unas mezclas de aceite de soja y de lecitina. De igual manera, también se adecuan unos aceites de siliconas, unos poli(etilenglicoles) o una hidroxietil-celulosa. Mediante el tratamiento de las superficies con los aceites mencionados se consiguen una resistencia aumentada a la abrasión del producto y una disminución de la proporción de polvo fino. El contenido de aceite en el producto es de 0,02 a 2,0 % en peso, de manera preferida de 0,02 a 1,0 % en peso, y de manera muy especialmente preferida de 0,2 a 1,0 % en peso, referido a la cantidad total del aditivo para piensos.

60 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 fino, es decir de partículas con un tamaño de granos < 100 µm, se sitúa de manera preferida en > 0 a 1 % en peso, - de manera especialmente preferida en como máximo 0,5 % en peso.

65 Alternativamente, el producto se puede extender sin embargo 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 unos usuales agentes espesantes o aglutinantes. Unos correspondientes ejemplos de usos y procedimientos para ello 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 unos procedimientos de revestimiento (en inglés "coating") con unos agentes formadores de películas, tales como por ejemplo carbonatos metálicos, ácidos silícicos, silicatos, alginatos, estearatos, almidones, gomas y éteres de celulosa, tal como se ha descrito en el documento de patente alemana DE-C-4100920.

Para el ajuste de una deseada concentración de aminoácidos en el producto, según sea el requisito, el respectivo aminoácido se puede añadir durante el proceso 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 que se ha obtenido o que ha sido aumentado de concentración, 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, de un modo correspondiente a la siguiente fórmula,

$$2x \{ [SO_4^{2-}] + [Cl^-] - [NH_4^+] - [Na^+] - [K^+] - 2x[Mg^{2+}] - 2x[Ca^{2+}] \} / [L-Lys]$$

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

En el caso de la lisina, el producto sólido constituido sobre la base del caldo de fermentación, producido de esta manera, tiene un contenido de lisina (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 constituido sobre la base del caldo de fermentación, producido de esta manera, 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 de 95 % en peso.

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

Por lo tanto, un objeto del invento es 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 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, siendo formada la biomasa eventualmente desactivada a partir de bacterias corineformes conformes al invento.

Por lo demás, es un objeto del invento 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, siendo formada la biomasa eventualmente desactivada a partir de bacterias corineformes conformes al invento.

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

- 5 El mutante de *Corynebacterium glutamicum* DM1808 conforme al invento, que contiene L-fenilalanina en la posición 111 de la secuencia de aminoácidos del polipéptido Mqo, se depositó el 24 de noviembre de 2004 en la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Alemania) como DSM 16937.

Ejemplos

10

Ejemplo 1

Mutagénesis de la cepa DM1797 que produce L-lisina

- 15 La cepa DM1797 de *Corynebacterium glutamicum* 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).

- 20 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 (de 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 de nuevo 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.

30

Ejemplo 2

- 35 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.

- 40 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) inicial (a 660 nm) del cultivo principal fue de 0,1 DO. Para el cultivo principal se utilizó asimismo el medio MM.

45

Medio MM

	CSL	5 g/l
	MOPS	20 g/l
50	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
55	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
60	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 autoclavaron. A continuación se añadieron las soluciones estériles de substrato y de vitaminas así como el CaCO₃ autoclavado seco.

65

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 %.

- 5 Después de 48 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, München). La cantidad de lisina formada se determinó con un analizador de aminoácidos BioTronik de la entidad Eppendorf (Hamburg, 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 DM1808.

10

Tabla 1

Cepa	DO (660)	Lisina-HCl (g/l)
DM1797	12,1	4,9
DM1808	12,0	5,3

Ejemplo 3

15

Secuenciación del gen m_{qo} del mutante DM1808

- A partir del clon DM1808, 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 m_{qo}. Para esto se utilizaron los siguientes oligonucleótidos como cebadores:

20

m_{qo}-A1 (SEQ ID NO: 13):

5` ggtgaaacttccgcatact 3`

m_{qo}-E1 (SEQ ID NO: 14):

5` gtgtcgccta aatcacactg 3`

25

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 2 kb (kilobases), que lleva el gen m_{qo}. El cebador m_{qo}-A1 se fija a la región que corresponde a las posiciones 22 hasta 41 de la cadena complementaria con respecto a la SEQ ID NO: 3. El cebador m_{qo}-E1 se fija a la región que corresponde a las posiciones 2.002 hasta 1.983 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, Frankfurt, 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 una adición de H₂O se ajustó el volumen a 50 µl.

- 35 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 2 kb se identificó, se aisló a partir del gel y se purificó mediante utilización del estuche QIAquick Gel Extraction Kit de la entidad Qiagen (Hilden, Alemania).

40

- La secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN amplificado o respectivamente del producto de la PCR fue determinada por la entidad Agowa (Berlín, Alemania). La secuencia obtenida de la región codificadora del alelo de m_{qo} se representa en la SEQ ID NO: 5. La secuencia de aminoácidos, que se establece con ayuda del programa Patentin, se representa en la SEQ ID NO: 6.

45

- La secuencia de nucleótidos de la región codificadora del alelo de m_{qo} del mutante DM1808 contiene en la posición 332 la nucleobase timina (véase la SEQ ID NO: 5). El gen del tipo silvestre (véase la SEQ ID NO: 1) contiene en esta posición la nucleobase citosina. Esta transición de citosina a timina conduce a un intercambio de aminoácidos de serina por fenilalanina en la posición 111 de la secuencia de aminoácidos resultante. Esta mutación se designa a continuación como m_{qo}S111F.

50

Ejemplo 4

Construcción del vector de intercambio pk18mobsacB_mqoS111F

- 5 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 mqo, que contiene la mutación mqoS111F. Como molde se utilizó el ADN cromosomal obtenido en el Ejemplo 3. Se escogieron los siguientes oligonucleótidos como cebadores para la PCR:

mqo-int1-bam (SEQ ID NO: 27):

5` ctag-ggatcc-ccgaagaacgcaccgaggat 3`

mqo-int2-bam (SEQ ID NO: 28):

5` ctag-ggatcc-ggcggatggacttgaacagg 3`

- 10 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 1,05 kb. Los nucleótidos 11 hasta 30 del cebador mqo-int1-bam se fijan a la región correspondiente a las posiciones 362 hasta 381 de la cadena complementaria con respecto a la SEQ ID NO: 3. Las posiciones 362 y 381 de la SEQ ID NO:3 corresponden a las posiciones 13 y 32 en la SEQ ID NO: 1. Los nucleótidos 11 hasta 30 del cebador mqo-int2-bam se fijan a la región correspondiente a las posiciones 1.385 hasta 1.366 de la cadena de acuerdo con la SEQ ID NO: 3. Las posiciones 1.385 y 1.366 de la SEQ ID NO:3 corresponden a las posiciones 1.036 y 1.017 de la SEQ ID NO: 1. Además de ello, los cebadores contienen las secuencias para los sitios de corte por la endonucleasa de restricción BamHI, que se han marcado mediante subrayado en la secuencia de nucleótidos arriba representada.

- 20 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 más 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.

- 25 El material amplificado con una longitud de aproximadamente 1,05 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.

- 30 El fragmento de ADN purificado de esta manera contiene la mutación mqoS111F descrita y posee unos extremos compatibles con BamHI (fragmento mqoS111F o respectivamente "mqo" 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 mqoS111F y la tanda se trató con el estuche Ready-To-Go T4 DNA Ligase Kit (de Amersham-Pharmacia, Freiburg, Alemania).

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

- 45 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 EcoRI, y mediante una subsiguiente electroforesis en gel de agarosa. El plásmido fue denominado pK18mobsacB_mqoS111F y se ha representado en la Figura 1.

50 Ejemplo 5

Incorporación de la mutación mqoS111F en la cepa DM1797

- 55 El vector pK18mobsacB_mqoS111F 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_mqoS111F integrado, se efectuó

5 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 unos 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.

10 El plásmido pK18mobsacB_mqoS111F, 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 sucrasa procedente de *Bacillus subtilis*. La expresión del gen sacB, inducible por sacarosa, conduce a la formación de la levano sucrasa, que cataliza la síntesis del producto levano, que es tóxico para *C. glutamicum*. Sobre un agar LB suplementado con sucrosa (= sacarosa) crecen por lo tanto sólo aquellos clones, en los que el pK18mobsacB_mqoS111F 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.

20 A continuación se buscó un clon, en el que se había efectuado el intercambio deseado, es decir la incorporación de la mutación mqoS111F. 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 mqo. De esta manera se identificó un clon, que lleva la mutación mqoS111F. Esta cepa fue designada como *C. glutamicum* DM1797_mqoS111F.

25 Ejemplo 6

Comparación del rendimiento de la cepa DM1797_mqoS111F con la cepa de partida DM1797.

30 El ensayo de rendimiento se llevó a cabo tal como se ha descrito en el Ejemplo 2. La cepa DM1797_mqoS111F mostró, en comparación con la cepa DM1797, una segregación manifiestamente aumentada de lisina, similar a la de la DM1808 (véase la Tabla 1).

35 Breve descripción de la Figura:

Figura 1: Mapa del plásmido pK18mobsacB_mqoS111F

40 Las abreviaturas utilizadas y las denominaciones tienen los siguientes significados. En el caso de la indicación de los números de pares de bases se trata de unos valores aproximados, que se obtuvieron dentro del marco de la reproducibilidad de las mediciones.

Kan:	gen de resistencia a kanamicina
BamHI:	sitio de corte de la enzima de restricción EcoRI
45 EcoRI:	sitio de corte de la enzima de restricción EcoRI
´mqo´:	fragmento de ADN clonado que contiene un segmento interno del alelo de mqoS111F
50 sacB:	gen sacB
RP4-mob:	región mob con el origen de la replicación para la transferencia (oriT)
oriV:	origen de la replicación V

55

ES 2 500 365 T3

LISTA DE SECUENCIAS:

- <110> Degussa AG
- 5 <120> Alelos del gen mqo procedente de bacterias corineformes
- <130> 040041 BT
- <160> 26
- 10 <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 1503
- 15 <212> ADN
- <213> Corynebacterium glutamicum
- <220>
- <221> CDSS
- 20 <222> (1)..(1500)
- <223> gen mqo de tipo silvestre

<400> 1	atg tca gat tcc ccg aag aac gca ccg agg att acc gat gag gca gat	48
	Met Ser Asp Ser Pro Lys Asn Ala Pro Arg Ile Thr Asp Glu Ala Asp	
	1 5 10 15	
	gta gtt ctc att ggt gcc ggt atc atg agc tcc acg ctg ggt gca atg	96
	Val Val Leu Ile Gly Ala Gly Ile Met Ser Ser Thr Leu Gly Ala Met	
	20 25 30	
	ctg cgt cag ctg gag cca agc tgg act cag atc gtc ttc gag cgt ttg	144
	Leu Arg Gln Leu Glu Pro Ser Trp Thr Gln Ile Val Phe Glu Arg Leu	
	35 40 45	
	gat gga ccg gca caa gag tcg tcc tcc ccg tgg aac aat gca gga acc	192
	Asp Gly Pro Ala Gln Glu Ser Ser Ser Pro Trp Asn Asn Ala Gly Thr	
	50 55 60	
	ggc cac tct gct cta tgc gag ctg aac tac acc cca gag gtt aag ggc	240
	Gly His Ser Ala Leu Cys Glu Leu Asn Tyr Thr Pro Glu Val Lys Gly	
	65 70 75 80	
	aag gtt gaa att gcc aag gct gta gga atc aac gag aag ttc cag gtt	288
	Lys Val Glu Ile Ala Lys Ala Val Gly Ile Asn Glu Lys Phe Gln Val	
	85 90 95	
	tcc cgt cag ttc tgg tct cac ctg gtt gaa gag gga gtg ctg tct gat	336
	Ser Arg Gln Phe Trp Ser His Leu Val Glu Glu Gly Val Leu Ser Asp	
	100 105 110	
	cct aag gaa ttc atc aac cct gtt cct cac gta tct ttc ggc cag ggc	384
	Pro Lys Glu Phe Ile Asn Pro Val Pro His Val Ser Phe Gly Gln Gly	
	115 120 125	
	gca gat cag gtt gca tac atc aag gct cgc tac gaa gct ttg aag gat	432
	Ala Asp Gln Val Ala Tyr Ile Lys Ala Arg Tyr Glu Ala Leu Lys Asp	
	130 135 140	
	cac cca ctc ttc cag ggc atg acc tac gct gac gat gaa gct acc ttc	480
	His Pro Leu Phe Gln Gly Met Thr Tyr Ala Asp Asp Glu Ala Thr Phe	
	145 150 155 160	
	acc gag aag ctg cct ttg atg gca aag ggc cgt gac ttc tct gat cca	528
	Thr Glu Lys Leu Pro Leu Met Ala Lys Gly Arg Asp Phe Ser Asp Pro	
	165 170 175	
	gta gca atc tct tgg atc gat gaa ggc acc gac atc aac tac ggt gct	576

ES 2 500 365 T3

val	Ala	Ile	Ser 180	Trp	Ile	Asp	Glu	Gly 185	Thr	Asp	Ile	Asn	Tyr 190	Gly	Ala		
cag	acc	aag	cag	tac	ctg	gat	gca	gct	gaa	gtt	gaa	ggc	act	gaa	atc		624
Gln	Thr	Lys 195	Gln	Tyr	Leu	Asp	Ala 200	Ala	Glu	Val	Glu	Gly 205	Thr	Glu	Ile		
cgc	tat	ggc	cac	gaa	gtc	aag	agc	atc	aag	gct	gat	ggc	gca	aag	tgg		672
Arg	Tyr 210	Gly	His	Glu	Val	Lys 215	Ser	Ile	Lys	Ala	Asp 220	Gly	Ala	Lys	Trp		
atc	gtg	acc	gtc	aag	aac	gta	cac	act	ggc	gac	acc	aag	acc	atc	aag		720
Ile 225	Val	Thr	Val	Lys	Asn 230	Val	His	Thr	Gly	Asp 235	Thr	Lys	Thr	Ile	Lys 240		
gca	aac	ttc	gtg	ttc	gtc	ggc	gca	ggc	gga	tac	gca	ctg	gat	ctg	ctt		768
Ala	Asn	Phe	Val	Phe 245	Val	Gly	Ala	Gly	Gly 250	Tyr	Ala	Leu	Asp	Leu 255	Leu		
cgc	agc	gca	ggc	atc	cca	cag	gtc	aag	ggc	ttc	gct	gga	ttc	cca	gta		816
Arg	Ser	Ala	Gly 260	Ile	Pro	Gln	Val	Lys 265	Gly	Phe	Ala	Gly	Phe 270	Pro	Val		
tcc	ggc	ctg	tgg	ctt	cgt	tgc	acc	aac	gag	gaa	ctg	atc	gag	cag	cac		864
Ser	Gly	Leu 275	Trp	Leu	Arg	Cys	Thr 280	Asn	Glu	Glu	Leu	Ile 285	Glu	Gln	His		
gca	gcc	aag	gta	tat	ggc	aag	gca	tct	gtt	ggc	gct	cct	cca	atg	tct		912
Ala	Ala 290	Lys	Val	Tyr	Gly	Lys 295	Ala	Ser	Val	Gly	Ala 300	Pro	Pro	Met	Ser		
gtt	cct	cac	ctt	gac	acc	cgc	gtt	atc	gag	ggt	gaa	aag	ggt	ctg	ctc		960
Val 305	Pro	His	Leu	Asp	Thr 310	Arg	Val	Ile	Glu	Gly 315	Glu	Lys	Gly	Leu	Leu 320		
ttt	gga	cct	tac	ggt	ggc	tgg	acc	cct	aag	ttc	ttg	aag	gaa	ggc	tcc		1008
Phe	Gly	Pro	Tyr	Gly 325	Gly	Trp	Thr	Pro	Lys 330	Phe	Leu	Lys	Glu	Gly 335	Ser		
tac	ctg	gac	ctg	ttc	aag	tcc	atc	cgc	cca	gac	aac	att	cct	tcc	tac		1056
Tyr	Leu	Asp	Leu 340	Phe	Lys	Ser	Ile	Arg 345	Pro	Asp	Asn	Ile	Pro 350	Ser	Tyr		
ctt	ggc	gtt	gct	gct	cag	gaa	ttt	gat	ctg	acc	aag	tac	ctt	gtc	act		1104
Leu	Gly	Val 355	Ala	Ala	Gln	Glu	Phe 360	Asp	Leu	Thr	Lys	Tyr 365	Leu	Val	Thr		
gaa	gtt	ctc	aag	gac	cag	gac	aag	cgt	atg	gat	gct	ctt	cgc	gag	tac		1152
Glu	Val 370	Leu	Lys	Asp	Gln	Asp 375	Lys	Arg	Met	Asp	Ala 380	Leu	Arg	Glu	Tyr		
atg	cca	gag	gca	caa	aac	ggc	gat	tgg	gag	acc	atc	gtt	gcc	gga	cag		1200
Met 385	Pro	Glu	Ala	Gln	Asn 390	Gly	Asp	Trp	Glu	Thr 395	Ile	Val	Ala	Gly	Gln 400		
cgt	gtt	cag	gtt	att	aag	cct	gca	gga	ttc	cct	aag	ttc	ggt	tcc	ctg		1248
Arg	Val	Gln	Val	Ile 405	Lys	Pro	Ala	Gly	Phe 410	Pro	Lys	Phe	Gly	Ser 415	Leu		
gaa	ttc	ggc	acc	acc	ttg	atc	aac	aac	tcc	gaa	ggc	acc	atc	gcc	gga		1296
Glu	Phe	Gly	Thr 420	Thr	Leu	Ile	Asn	Asn 425	Ser	Glu	Gly	Thr	Ile 430	Ala	Gly		
ttg	ctc	ggt	gct	tcc	cct	gga	gca	tcc	atc	gca	cct	tcc	gca	atg	atc		1344
Leu	Leu	Gly 435	Ala	Ser	Pro	Gly	Ala 440	Ser	Ile	Ala	Pro	Ser 445	Ala	Met	Ile		
gag	ctg	ctt	gag	cgt	tgc	ttc	ggt	gac	cgc	atg	atc	gag	tgg	ggc	gac		1392
Glu	Leu	Leu	Glu	Arg	Cys	Phe	Gly	Asp	Arg	Met	Ile	Glu	Trp	Gly	Asp		

ES 2 500 365 T3

```

      450              455      -----      460
aag ctg aag gac atg atc cct tcc tac ggc aag aag ctt gct tcc gag      1440
Lys Leu Lys Asp Met Ile Pro Ser Tyr Gly Lys Lys Leu Ala Ser Glu
465                               470                               475                               480

cca gca ctg ttt gag cag cag tgg gca cgc acc cag aag acc ctg aag      1488
Pro Ala Leu Phe Glu Gln Gln Trp Ala Arg Thr Gln Lys Thr Leu Lys
                               485                               490                               495

ctt gag gaa gcc taa
Leu Glu Glu Ala
                               500
    
```

<210> 2

<211> 500

<212> PRT

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 2

```

Met Ser Asp Ser Pro Lys Asn Ala Pro Arg Ile Thr Asp Glu Ala Asp
 1      5      10      15

val val leu ile gly ala gly ile met ser ser thr leu gly ala met
 20      25      30

leu arg gln leu glu pro ser trp thr gln ile val phe glu arg leu
 35      40      45

asp gly pro ala gln glu ser ser ser pro trp asn asn ala gly thr
 50      55      60

gly his ser ala leu cys glu leu asn tyr thr pro glu val lys gly
 65      70      75      80

lys val glu ile ala lys ala val gly ile asn glu lys phe gln val
 85      90      95

ser arg gln phe trp ser his leu val glu glu gly val leu ser asp
100     105     110

pro lys glu phe ile asn pro val pro his val ser phe gly gln gly
115     120     125

ala asp gln val ala tyr ile lys ala arg tyr glu ala leu lys asp
130     135     140

his pro leu phe gln gly met thr tyr ala asp asp glu ala thr phe
145     150     155     160

thr glu lys leu pro leu met ala lys gly arg asp phe ser asp pro
165     170     175

val ala ile ser trp ile asp glu gly thr asp ile asn tyr gly ala
180     185     190
    
```

Gln Thr Lys Gln Tyr Leu Asp Ala Ala Glu Val Glu Gly Thr Glu Ile
 195 200 205
 Arg Tyr Gly His Glu Val Lys Ser Ile Lys Ala Asp Gly Ala Lys Trp
 210 215 220
 Ile Val Thr Val Lys Asn Val His Thr Gly Asp Thr Lys Thr Ile Lys
 225 230 235 240
 Ala Asn Phe Val Phe Val Gly Ala Gly Gly Tyr Ala Leu Asp Leu Leu
 245 250 255
 Arg Ser Ala Gly Ile Pro Gln Val Lys Gly Phe Ala Gly Phe Pro Val
 260 265 270
 Ser Gly Leu Trp Leu Arg Cys Thr Asn Glu Glu Leu Ile Glu Gln His
 275 280 285
 Ala Ala Lys Val Tyr Gly Lys Ala Ser Val Gly Ala Pro Pro Met Ser
 290 295 300
 Val Pro His Leu Asp Thr Arg Val Ile Glu Gly Glu Lys Gly Leu Leu
 305 310 315 320
 Phe Gly Pro Tyr Gly Gly Trp Thr Pro Lys Phe Leu Lys Glu Gly Ser
 325 330 335
 Tyr Leu Asp Leu Phe Lys Ser Ile Arg Pro Asp Asn Ile Pro Ser Tyr
 340 345 350
 Leu Gly Val Ala Ala Gln Glu Phe Asp Leu Thr Lys Tyr Leu Val Thr
 355 360 365
 Glu Val Leu Lys Asp Gln Asp Lys Arg Met Asp Ala Leu Arg Glu Tyr
 370 375 380
 Met Pro Glu Ala Gln Asn Gly Asp Trp Glu Thr Ile Val Ala Gly Gln
 385 390 395 400
 Arg Val Gln Val Ile Lys Pro Ala Gly Phe Pro Lys Phe Gly Ser Leu
 405 410 415
 Glu Phe Gly Thr Thr Leu Ile Asn Asn Ser Glu Gly Thr Ile Ala Gly
 420 425 430
 Leu Leu Gly Ala Ser Pro Gly Ala Ser Ile Ala Pro Ser Ala Met Ile
 435 440 445
 Glu Leu Leu Glu Arg Cys Phe Gly Asp Arg Met Ile Glu Trp Gly Asp
 450 455 460

Lys Leu Lys Asp Met Ile Pro Ser Tyr Gly Lys Lys Leu Ala Ser Glu
 465 470 475 480

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

Leu Glu Glu Ala
 500

<210> 3
 <211> 2002
 <212> ADN
 5 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <221> CDS
 <222> (350)..(1849)
 10 <223> gen mco de tipo silvestre

<400> 3
 agtcgactga aatgttcacg tgggtgaaact tccgcgatac tactcatggt tgcgaattgc 60
 acatttacta actttgcaaa ttgggggagg gggtagcgcg ggggaggaat tcgcatgaga 120
 aaggggaata tcccgtgctt gtttattcag ctcgaggtgg caggcgtaca ctctatattc 180
 acggacaatg tgtaccacg ctttcttgta agaaacaaga agggtaacgc cccacgcgtc 240
 agtcaaaaat atggccaaca cttgcattcg ggtgctggcg atcatttatg agatgacgcc 300
 ttgtgttggg gttcggcaga gaactcgcgg agataaaagg aagttgaac atg tca gat 358
 Met Ser Asp
 1
 tcc ccg aag aac gca ccg agg att acc gat gag gca gat gta gtt ctc 406
 Ser Pro Lys Asn Ala Pro Arg Ile Thr Asp Glu Ala Asp Val Val Leu
 5 10 15
 att ggt gcc ggt atc atg agc tcc acg ctg ggt gca atg ctg cgt cag 454
 Ile Gly Ala Gly Ile Met Ser Ser Thr Leu Gly Ala Met Leu Arg Gln
 20 25 30 35
 ctg gag cca agc tgg act cag atc gtc ttc gag cgt ttg gat gga ccg 502
 Leu Glu Pro Ser Trp Thr Gln Ile Val Phe Glu Arg Leu Asp Gly Pro
 40 45 50
 gca caa gag tcg tcc tcc ccg tgg aac aat gca gga acc ggc cac tct 550
 Ala Gln Glu Ser Ser Ser Pro Trp Asn Asn Ala Gly Thr Gly His Ser
 55 60 65
 gct cta tgc gag ctg aac tac acc cca gag gtt aag ggc aag gtt gaa 598
 Ala Leu Cys Glu Leu Asn Tyr Thr Pro Glu Val Lys Gly Lys Val Glu
 70 75 80
 att gcc aag gct gta gga atc aac gag aag ttc cag gtt tcc cgt cag 646
 Ile Ala Lys Ala Val Gly Ile Asn Glu Lys Phe Gln Val Ser Arg Gln
 85 90 95
 ttc tgg tct cac ctc gtt gaa gag gga gtg ctg tct gat cct aag gaa 694
 Phe Trp Ser His Leu Val Glu Glu Gly Val Leu Ser Asp Pro Lys Glu
 100 105 110 115
 ttc atc aac cct gtt cct cac gta tct ttc ggc cag ggc gca gat cag 742
 Phe Ile Asn Pro Val Pro His Val Ser Phe Gly Gln Gly Ala Asp Gln
 120 125 130

gtt Val	gca Ala	tac Tyr	atc Ile 135	aag Lys	gct Ala	cgc Arg	tac Tyr	gaa Glu 140	gct Ala	ttg Leu	aag Lys	gat Asp	cac His 145	cca Pro	ctc Leu	790
ttc Phe	cag Gln	ggc Gly 150	atg Met	acc Thr	tac Tyr	gct Ala	gac Asp 155	gat Asp	gaa Glu	gct Ala	acc Thr	ttc Phe 160	acc Thr	gag Glu	aag Lys	838
ctg Leu	cct Pro 165	ttg Leu	atg Met	gca Ala	aag Lys	ggc Gly 170	cg Arg	gac Asp	ttc Phe	tct Ser	gat Asp 175	cca Pro	gta Val	gca Ala	atc Ile	886
tct Ser 180	tgg Trp	atc Ile	gat Asp	gaa Glu	ggc Gly 185	acc Thr	gac Asp	atc Ile	aac Asn	tac Tyr 190	ggt Gly	gct Ala	cag Gln	acc Thr	aag Lys 195	934
cag Gln	tac Tyr	ctg Leu	gat Asp	gca Ala 200	gct Ala	gaa Glu	ggt Val	gaa Glu	ggc Gly 205	act Thr	gaa Glu	atc Ile	cg Arg	tat Tyr 210	ggc Gly	982
cac His	gaa Glu	gtc Val	aag Lys 215	agc Ser	atc Ile	aag Lys	gct Ala	gat Asp 220	ggc Gly	gca Ala	aag Lys	tgg Trp	atc Ile 225	gtg Val	acc Thr	1030
gtc Val	aag Lys	aac Asn 230	gta Val	cac His	act Thr	ggc Gly	gac Asp 235	acc Thr	aag Lys	acc Thr	atc Ile	aag Lys 240	gca Ala	aac Asn	ttc Phe	1078
gtg Val	ttc Phe 245	gtc Val	ggc Gly	gca Ala	ggc Gly	gga Gly 250	tac Tyr	gca Ala	ctg Leu	gat Asp	ctg Leu 255	ctt Leu	cg Arg	agc Ser	gca Ala	1126
ggc Gly 260	atc Ile	cca Pro	cag Gln	gtc Val	aag Lys 265	ggc Gly	ttc Phe	gct Ala	gga Gly	ttc Phe 270	cca Pro	gta Val	tcc Ser	ggc Gly	ctg Leu 275	1174
tgg Trp	ctt Leu	cg Arg	tgc Cys	acc Thr 280	aac Asn	gag Glu	gaa Glu	ctg Leu	atc Ile 285	gag Glu	cag Gln	cac His	gca Ala	gcc Ala 290	aag Lys	1222
gta Val	tat Tyr	ggc Gly	aag Lys 295	gca Ala	tct Ser	ggt Val	ggc Gly	gct Ala 300	cct Pro	cca Pro	atg Met	tct Ser	ggt Val 305	cct Pro	cac His	1270
ctt Leu	gac Asp	acc Thr 310	cg Arg	ggt Val	atc Ile	gag Glu	ggt Gly 315	gaa Glu	aag Lys	ggt Gly	ctg Leu	ctc Leu 320	ttt Phe	gga Gly	cct Pro	1318
tac Tyr	ggt Gly 325	ggc Gly	tgg Trp	acc Thr	cct Pro	aag Lys 330	ttc Phe	ttg Leu	aag Lys	gaa Glu	ggc Gly 335	tcc Ser	tac Tyr	ctg Leu	gac Asp	1366
ctg Leu 340	ttc Phe	aag Lys	tcc Ser	atc Ile	cg Arg 345	cca Pro	gac Asp	aac Asn	att Ile	cct Pro 350	tcc Ser	tac Tyr	ctt Leu	ggc Gly	ggt Val 355	1414
gct Ala	gct Ala	cag Gln	gaa Glu	ttt Phe 360	gat Asp	ctg Leu	acc Thr	aag Lys	tac Tyr 365	ctt Leu	gtc Val	act Thr	gaa Glu	ggt Val 370	ctc Leu	1462
aag Lys	gac Asp	cag Gln	gac Asp 375	aag Lys	cg Arg	atg Met	gat Asp	gct Ala 380	ctt Leu	cg Arg	gag Glu	tac Tyr	atg Met 385	cca Pro	gag Glu	1510
gca Ala	caa Gln	aac Asn 390	ggc Gly	gat Asp	tgg Trp	gag Glu	acc Thr 395	atc Ile	ggt Val	gcc Ala	gga Gly	cag Gln 400	cg Arg	ggt Val	cag Gln	1558

ES 2 500 365 T3

gtt att aag cct gca gga ttc cct aag ttc ggt tcc ctg gaa ttc ggc 1606
 Val Ile Lys Pro Ala Gly Phe Pro Lys Phe Gly Ser Leu Glu Phe Gly
 405 410 415
 acc acc ttg atc aac aac tcc gaa ggc acc atc gcc gga ttg ctc ggt 1654
 Thr Thr Leu Ile Asn Asn Ser Glu Gly Thr Ile Ala Gly Leu Leu Gly
 420 425 430 435
 gct tcc cct gga gca tcc atc gca cct tcc gca atg atc gag ctg ctt 1702
 Ala Ser Pro Gly Ala Ser Ile Ala Pro Ser Ala Met Ile Glu Leu Leu
 440 445 450
 gag cgt tgc ttc ggt gac cgc atg atc gag tgg ggc gac aag ctg aag 1750
 Glu Arg Cys Phe Gly Asp Arg Met Ile Glu Trp Gly Asp Lys Leu Lys
 455 460 465
 gac atg atc cct tcc tac ggc aag aag ctt gct tcc gag cca gca ctg 1798
 Asp Met Ile Pro Ser Tyr Gly Lys Lys Leu Ala Ser Glu Pro Ala Leu
 470 475 480
 ttt gag cag cag tgg gca cgc acc cag aag acc ctg aag ctt gag gaa 1846
 Phe Glu Gln Gln Trp Ala Arg Thr Gln Lys Thr Leu Lys Leu Glu Glu
 485 490 495
 gcc taaatcttct aactgctttc tttaaagcac ccgcacatgt ctgttgaggt 1899
 Ala
 500
 ttcacctgcg gagacaatct ccgccttcat gggttggaac tgacacagtt gaaggcatgt 1959
 cgggtgcttt gcgtattctt tgccagtgtg atttaggcga cac 2002

<210> 4

<211> 500

<212> PRT

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 4

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

ES 2 500 365 T3

115					120					125						
Ala	Asp 130	Gln	Val	Ala	Tyr	Ile 135	Lys	Ala	Arg	Tyr	Glu 140	Ala	Leu	Lys	Asp	
His 145	Pro	Leu	Phe	Gln	Gly 150	Met	Thr	Tyr	Ala	Asp 155	Asp	Glu	Ala	Thr	Phe 160	
Thr	Glu	Lys	Leu	Pro 165	Leu	Met	Ala	Lys	Gly 170	Arg	Asp	Phe	Ser	Asp 175	Pro	
Val	Ala	Ile	Ser 180	Trp	Ile	Asp	Glu	Gly 185	Thr	Asp	Ile	Asn	Tyr 190	Gly	Ala	
Gln	Thr	Lys 195	Gln	Tyr	Leu	Asp	Ala 200	Ala	Glu	Val	Glu	Gly 205	Thr	Glu	Ile	
Arg	Tyr 210	Gly	His	Glu	Val	Lys 215	Ser	Ile	Lys	Ala	Asp 220	Gly	Ala	Lys	Trp	
Ile 225	Val	Thr	Val	Lys	Asn 230	Val	His	Thr	Gly	Asp 235	Thr	Lys	Thr	Ile	Lys 240	
Ala	Asn	Phe	Val	Phe 245	Val	Gly	Ala	Gly	Gly 250	Tyr	Ala	Leu	Asp	Leu 255	Leu	
Arg	Ser	Ala	Gly 260	Ile	Pro	Gln	Val	Lys 265	Gly	Phe	Ala	Gly	Phe 270	Pro	Val	
Ser	Gly	Leu 275	Trp	Leu	Arg	Cys	Thr 280	Asn	Glu	Glu	Leu	Ile 285	Glu	Gln	His	
Ala	Ala 290	Lys	Val	Tyr	Gly	Lys 295	Ala	Ser	Val	Gly	Ala 300	Pro	Pro	Met	Ser	
Val 305	Pro	His	Leu	Asp	Thr 310	Arg	Val	Ile	Glu	Gly 315	Glu	Lys	Gly	Leu	Leu 320	
Phe	Gly	Pro	Tyr	Gly 325	Gly	Trp	Thr	Pro	Lys 330	Phe	Leu	Lys	Glu	Gly 335	Ser	
Tyr	Leu	Asp	Leu 340	Phe	Lys	Ser	Ile	Arg 345	Pro	Asp	Asn	Ile	Pro 350	Ser	Tyr	
Leu	Gly	Val 355	Ala	Ala	Gln	Glu	Phe 360	Asp	Leu	Thr	Lys	Tyr 365	Leu	Val	Thr	
Glu	Val 370	Leu	Lys	Asp	Gln	Asp 375	Lys	Arg	Met	Asp	Ala 380	Leu	Arg	Glu	Tyr	
Met 385	Pro	Glu	Ala	Gln	Asn 390	Gly	Asp	Trp	Glu	Thr 395	Ile	Val	Ala	Gly	Gln 400	

Arg Val Gln Val Ile Lys Pro Ala Gly Phe Pro Lys Phe Gly Ser Leu
 405 410 415

Glu Phe Gly Thr Thr Leu Ile Asn Asn Ser Glu Gly Thr Ile Ala Gly
 420 425 430

Leu Leu Gly Ala Ser Pro Gly Ala Ser Ile Ala Pro Ser Ala Met Ile
 435 440 445

Glu Leu Leu Glu Arg Cys Phe Gly Asp Arg Met Ile Glu Trp Gly Asp
 450 455 460

Lys Leu Lys Asp Met Ile Pro Ser Tyr Gly Lys Lys Leu Ala Ser Glu
 465 470 475 480

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

Leu Glu Glu Ala
 500

<210> 5
 <211> 1503
 <212> ADN
 5 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1500)
 10 <223> alelo de mqo

<220>
 <221> mutación
 <222> (332)..(332)
 15 <223> transición: intercambio de citosina por timina

<400> 5
 atg tca gat tcc ccg aag aac gca ccg agg att acc gat gag gca gat 48
 Met Ser Asp Ser Pro Lys Asn Ala Pro Arg Ile Thr Asp Glu Ala Asp
 1 5 10 15

gta gtt ctc att ggt gcc ggt atc atg agc tcc acg ctg ggt gca atg 96
 Val Val Leu Ile Gly Ala Gly Ile Met Ser Ser Thr Leu Gly Ala Met
 20 25 30

ctg cgt cag ctg gag cca agc tgg act cag atc gtc ttc gag cgt ttg 144
 Leu Arg Gln Leu Glu Pro Ser Trp Thr Gln Ile Val Phe Glu Arg Leu
 35 40 45

gat gga ccg gca caa gag tcg tcc tcc ccg tgg aac aat gca gga acc 192
 Asp Gly Pro Ala Gln Glu Ser Ser Ser Pro Trp Asn Asn Ala Gly Thr
 50 55 60

ggc cac tct gct cta tgc gag ctg aac tac acc cca gag gtt aag ggc 240
 Gly His Ser Ala Leu Cys Glu Leu Asn Tyr Thr Pro Glu Val Lys Gly
 65 70 75 80

aag gtt gaa att gcc aag gct gta gga atc aac gag aag ttc cag gtt 288
 Lys Val Glu Ile Ala Lys Ala Val Gly Ile Asn Glu Lys Phe Gln Val

ES 2 500 365 T3

			85			90			95							
tcc	cgt	cag	ttc	tgg	tct	cac	ctc	gtt	gaa	gag	gga	gtg	ctg	ttt	gat	336
Ser	Arg	Gln	Phe	Trp	Ser	His	Leu	Val	Glu	Glu	Gly	Val	Leu	Phe	Asp	
			100					105					110			
cct	aag	gaa	ttc	atc	aac	cct	gtt	cct	cac	gta	tct	ttc	ggc	cag	ggc	384
Pro	Lys	Glu	Phe	Ile	Asn	Pro	Val	Pro	His	Val	Ser	Phe	Gly	Gln	Gly	
		115					120					125				
gca	gat	cag	gtt	gca	tac	atc	aag	gct	cgc	tac	gaa	gct	ttg	aag	gat	432
Ala	Asp	Gln	Val	Ala	Tyr	Ile	Lys	Ala	Arg	Tyr	Glu	Ala	Leu	Lys	Asp	
	130					135					140					
cac	cca	ctc	ttc	cag	ggc	atg	acc	tac	gct	gac	gat	gaa	gct	acc	ttc	480
His	Pro	Leu	Phe	Gln	Gly	Met	Thr	Tyr	Ala	Asp	Asp	Glu	Ala	Thr	Phe	
					150					155					160	
acc	gag	aag	ctg	cct	ttg	atg	gca	aag	ggc	cgt	gac	ttc	tct	gat	cca	528
Thr	Glu	Lys	Leu	Pro	Leu	Met	Ala	Lys	Gly	Arg	Asp	Phe	Ser	Asp	Pro	
				165					170					175		
gta	gca	atc	tct	tgg	atc	gat	gaa	ggc	acc	gac	atc	aac	tac	ggt	gct	576
Val	Ala	Ile	Ser	Trp	Ile	Asp	Glu	Gly	Thr	Asp	Ile	Asn	Tyr	Gly	Ala	
			180					185					190			
cag	acc	aag	cag	tac	ctg	gat	gca	gct	gaa	gta	gaa	ggc	act	gaa	atc	624
Gln	Thr	Lys	Gln	Tyr	Leu	Asp	Ala	Ala	Glu	Val	Glu	Gly	Thr	Glu	Ile	
		195					200					205				
cgc	tat	ggc	cac	gaa	gtc	aag	agc	atc	aag	gct	gat	ggc	gca	aag	tgg	672
Arg	Tyr	Gly	His	Glu	Val	Lys	Ser	Ile	Lys	Ala	Asp	Gly	Ala	Lys	Trp	
	210					215					220					
atc	gtg	acc	gtc	aag	aac	gta	cac	act	ggc	gac	acc	aag	acc	atc	aag	720
Ile	Val	Thr	Val	Lys	Asn	Val	His	Thr	Gly	Asp	Thr	Lys	Thr	Ile	Lys	
					230					235					240	
gca	aac	ttc	gtg	ttc	gtc	ggc	gca	ggc	gga	tac	gca	ctg	gat	ctg	ctt	768
Ala	Asn	Phe	Val	Phe	Val	Gly	Ala	Gly	Gly	Tyr	Ala	Leu	Asp	Leu	Leu	
				245					250					255		
cgc	agc	gca	ggc	atc	cca	cag	gtc	aag	ggc	ttc	gct	gga	ttc	cca	gta	816
Arg	Ser	Ala	Gly	Ile	Pro	Gln	Val	Lys	Gly	Phe	Ala	Gly	Phe	Pro	Val	
			260					265					270			
tcc	ggc	ctg	tgg	ctt	cgt	tgc	acc	aac	gag	gaa	ctg	atc	gag	cag	cac	864
Ser	Gly	Leu	Trp	Leu	Arg	Cys	Thr	Asn	Glu	Glu	Leu	Ile	Glu	Gln	His	
		275					280					285				
gca	gcc	aag	gta	tat	ggc	aag	gca	tct	gtt	ggc	gct	cct	cca	atg	tct	912
Ala	Ala	Lys	Val	Tyr	Gly	Lys	Ala	Ser	Val	Gly	Ala	Pro	Pro	Met	Ser	
	290					295					300					
gtt	cct	cac	ctt	gac	acc	cgc	gtt	atc	gag	ggt	gaa	aag	ggt	ctg	ctc	960
Val	Pro	His	Leu	Asp	Thr	Arg	Val	Ile	Glu	Gly	Glu	Lys	Gly	Leu	Leu	
	305				310					315					320	
ttt	gga	cct	tac	ggt	ggc	tgg	acc	cct	aag	ttc	ttg	aag	gaa	ggc	tcc	1008
Phe	Gly	Pro	Tyr	Gly	Gly	Trp	Thr	Pro	Lys	Phe	Leu	Lys	Glu	Gly	Ser	
				325					330					335		
tac	ctg	gac	ctg	ttc	aag	tcc	atc	cgc	cca	gac	aac	att	cct	tcc	tac	1056
Tyr	Leu	Asp	Leu	Phe	Lys	Ser	Ile	Arg	Pro	Asp	Asn	Ile	Pro	Ser	Tyr	
			340					345					350			
ctt	ggc	gtt	gct	gct	cag	gaa	ttt	gat	ctg	acc	aag	tac	ctt	gtc	act	1104
Leu	Gly	Val	Ala	Ala	Gln	Glu	Phe	Asp	Leu	Thr	Lys	Tyr	Leu	Val	Thr	

ES 2 500 365 T3

	355		360		365															
	gaa	gtt	ctc	aag	gac	cag	gac	aag	cgt	atg	gat	gct	ctt	cgc	gag	tac				1152
	Glu	Val	Leu	Lys	Asp	Gln	Asp	Lys	Arg	Met	Asp	Ala	Leu	Arg	Glu	Tyr				
		370					375					380								
	atg	cca	gag	gca	caa	aac	ggc	gat	tgg	gag	acc	atc	gtt	gcc	gga	cag				1200
	Met	Pro	Glu	Ala	Gln	Asn	Gly	Asp	Trp	Glu	Thr	Ile	Val	Ala	Gly	Gln				
	385					390					395					400				
	cgt	gtt	cag	ggt	att	aag	cct	gca	gga	ttc	cct	aag	ttc	ggt	tcc	ctg				1248
	Arg	Val	Gln	Val	Ile	Lys	Pro	Ala	Gly	Phe	Pro	Lys	Phe	Gly	Ser	Leu				
					405					410					415					
	gaa	ttc	ggc	acc	acc	ttg	atc	aac	aac	tcc	gaa	ggc	acc	atc	gcc	gga				1296
	Glu	Phe	Gly	Thr	Thr	Leu	Ile	Asn	Asn	Ser	Glu	Gly	Thr	Ile	Ala	Gly				
				420					425					430						
	ttg	ctc	ggt	gct	tcc	cct	gga	gca	tcc	atc	gca	cct	tcc	gca	atg	atc				1344
	Leu	Leu	Gly	Ala	Ser	Pro	Gly	Ala	Ser	Ile	Ala	Pro	Ser	Ala	Met	Ile				
			435				440						445							
	gag	ctg	ctt	gag	cgt	tgc	ttc	ggt	gac	cgc	atg	atc	gag	tgg	ggc	gac				1392
	Glu	Leu	Leu	Glu	Arg	Cys	Phe	Gly	Asp	Arg	Met	Ile	Glu	Trp	Gly	Asp				
		450				455						460								
	aag	ctg	aag	gac	atg	atc	cct	tcc	tac	ggc	aag	aag	ctt	gct	tcc	gag				1440
	Lys	Leu	Lys	Asp	Met	Ile	Pro	Ser	Tyr	Gly	Lys	Lys	Leu	Ala	Ser	Glu				
	465					470					475					480				
	cca	gca	ctg	ttt	gag	cag	cag	tgg	gca	cgc	acc	cag	aag	acc	ctg	aag				1488
	Pro	Ala	Leu	Phe	Glu	Gln	Gln	Trp	Ala	Arg	Thr	Gln	Lys	Thr	Leu	Lys				
					485					490					495					
	ctt	gag	gaa	gcc	taa															1503
	Leu	Glu	Glu	Ala																
				500																

<210> 6

<211> 500

<212> PRT

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 6

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

Ser Arg Gln Phe Trp Ser His Leu Val Glu Glu Gly Val Leu Phe Asp
 100 105 110

Pro Lys Glu Phe Ile Asn Pro Val Pro His Val Ser Phe Gly Gln Gly
 115 120 125

Ala Asp Gln Val Ala Tyr Ile Lys Ala Arg Tyr Glu Ala Leu Lys Asp
 130 135 140

His Pro Leu Phe Gln Gly Met Thr Tyr Ala Asp Asp Glu Ala Thr Phe
 145 150 155 160

Thr Glu Lys Leu Pro Leu Met Ala Lys Gly Arg Asp Phe Ser Asp Pro
 165 170 175

Val Ala Ile Ser Trp Ile Asp Glu Gly Thr Asp Ile Asn Tyr Gly Ala
 180 185 190

Gln Thr Lys Gln Tyr Leu Asp Ala Ala Glu Val Glu Gly Thr Glu Ile
 195 200 205

Arg Tyr Gly His Glu Val Lys Ser Ile Lys Ala Asp Gly Ala Lys Trp
 210 215 220

Ile Val Thr Val Lys Asn Val His Thr Gly Asp Thr Lys Thr Ile Lys
 225 230 235 240

Ala Asn Phe Val Phe Val Gly Ala Gly Gly Tyr Ala Leu Asp Leu Leu
 245 250 255

Arg Ser Ala Gly Ile Pro Gln Val Lys Gly Phe Ala Gly Phe Pro Val
 260 265 270

Ser Gly Leu Trp Leu Arg Cys Thr Asn Glu Glu Leu Ile Glu Gln His
 275 280 285

Ala Ala Lys Val Tyr Gly Lys Ala Ser Val Gly Ala Pro Pro Met Ser
 290 295 300

Val Pro His Leu Asp Thr Arg Val Ile Glu Gly Glu Lys Gly Leu Leu
 305 310 315 320

Phe Gly Pro Tyr Gly Gly Trp Thr Pro Lys Phe Leu Lys Glu Gly Ser
 325 330 335

Tyr Leu Asp Leu Phe Lys Ser Ile Arg Pro Asp Asn Ile Pro Ser Tyr
 340 345 350

Leu Gly Val Ala Ala Gln Glu Phe Asp Leu Thr Lys Tyr Leu Val Thr
 355 360 365

Glu Val Leu Lys Asp Gln Asp Lys Arg Met Asp Ala Leu Arg Glu Tyr
 370 375 380
 Met Pro Glu Ala Gln Asn Gly Asp Trp Glu Thr Ile Val Ala Gly Gln
 385 390 395 400
 Arg Val Gln Val Ile Lys Pro Ala Gly Phe Pro Lys Phe Gly Ser Leu
 405 410 415
 Glu Phe Gly Thr Thr Leu Ile Asn Asn Ser Glu Gly Thr Ile Ala Gly
 420 425 430
 Leu Leu Gly Ala Ser Pro Gly Ala Ser Ile Ala Pro Ser Ala Met Ile
 435 440 445
 Glu Leu Leu Glu Arg Cys Phe Gly Asp Arg Met Ile Glu Trp Gly Asp
 450 455 460
 Lys Leu Lys Asp Met Ile Pro Ser Tyr Gly Lys Lys Leu Ala Ser Glu
 465 470 475 480
 Pro Ala Leu Phe Glu Gln Gln Trp Ala Arg Thr Gln Lys Thr Leu Lys
 485 490 495
 Leu Glu Glu Ala
 500

<210> 7

<211> 1503

<212> ADN

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1542)

10 <223> alelo de mqo

<220>

<221> mutación

<222> (331)..(331)

15 <223> transversión: intercambio de timina por guanina

<400> 7

atg tca gat tcc ccg aag aac gca ccg agg att acc gat gag gca gat 48
 Met Ser Asp Ser Pro Lys Asn Ala Pro Arg Ile Thr Asp Glu Ala Asp
 1 5 10 15

gta gtt ctc att ggt gcc ggt atc atg agc tcc acg ctg ggt gca atg 96
 Val Val Leu Ile Gly Ala Gly Ile Met Ser Ser Thr Leu Gly Ala Met
 20 25 30

ctg cgt cag ctg gag cca agc tgg act cag atc gtc ttc gag cgt ttg 144
 Leu Arg Gln Leu Glu Pro Ser Trp Thr Gln Ile Val Phe Glu Arg Leu
 35 40 45

gat gga ccg gca caa gag tcg tcc tcc ccg tgg aac aat gca gga acc 192
 Asp Gly Pro Ala Gln Glu Ser Ser Ser Pro Trp Asn Asn Ala Gly Thr
 50 55 60

ES 2 500 365 T3

ggc Gly 65	cac His	tct Ser	gct Ala	cta Leu	tgc Cys 70	gag Glu	ctg Leu	aac Asn	tac Tyr	acc Thr 75	cca Pro	gag Glu	gtt Val	aag Lys	ggc Gly 80	240
aag Lys	gtt Val	gaa Glu	att Ile	gcc Ala 85	aag Lys	gct Ala	gta Val	gga Gly	atc Ile 90	aac Asn	gag Glu	aag Lys	ttc Phe	cag Gln 95	gtt Val	288
tcc Ser	cg Arg	cag Gln	ttc Phe 100	tgg Trp	tct Ser	cac His	ctc Leu	ggt Val 105	gaa Glu	gag Glu	gga Gly	gtg Val	ctg Leu 110	gct Ala	gat Asp	336
cct Pro	aag Lys	gaa Glu 115	ttc Phe	atc Ile	aac Asn	cct Pro	ggt Val 120	cct Pro	cac His	gta Val	tct Ser	ttc Phe 125	ggc Gly	cag Gln	ggc Gly	384
gca Ala 130	gat Asp	cag Gln	ggt Val	gca Ala	tac Tyr	atc Ile 135	aag Lys	gct Ala	cg Arg	tac Tyr	gaa Glu 140	gct Ala	ttg Leu	aag Lys	gat Asp	432
cac His 145	cca Pro	ctc Leu	ttc Phe	cag Gln	ggc Gly 150	atg Met	acc Thr	tac Tyr	gct Ala	gac Asp 155	gat Asp	gaa Glu	gct Ala	acc Thr	ttc Phe 160	480
acc Thr	gag Glu	aag Lys	ctg Leu	cct Pro 165	ttg Leu	atg Met	gca Ala	aag Lys	ggc Gly 170	cg Arg	gac Asp	ttc Phe	tct Ser	gat Asp 175	cca Pro	528
gta Val	gca Ala	atc Ile	tct Ser 180	tgg Trp	atc Ile	gat Asp	gaa Glu	ggc Gly 185	acc Thr	gac Asp	atc Ile	aac Asn	tac Tyr 190	ggt Gly	gct Ala	576
cag Gln	acc Thr	aag Lys 195	cag Gln	tac Tyr	ctg Leu	gat Asp	gca Ala 200	gct Ala	gaa Glu	ggt Val	gaa Glu	ggc Gly 205	act Thr	gaa Glu	atc Ile	624
cg Arg	tat Tyr 210	ggc Gly	cac His	gaa Glu	gtc Val	aag Lys 215	agc Ser	atc Ile	aag Lys	gct Ala	gat Asp 220	ggc Gly	gca Ala	aag Lys	tgg Trp	672
atc Ile 225	gtg Val	acc Thr	gtc Val	aag Lys	aac Asn 230	gta Val	cac His	act Thr	ggc Gly	gac Asp 235	acc Thr	aag Lys	acc Thr	atc Ile	aag Lys 240	720
gca Ala	aac Asn	ttc Phe	gtg Val	ttc Phe 245	gtc Val	ggc Gly	gca Ala	ggc Gly	gga Gly 250	tac Tyr	gca Ala	ctg Leu	gat Asp	ctg Leu 255	ctt Leu	768
cg Arg	agc Ser	gca Ala	ggc Gly 260	atc Ile	cca Pro	cag Gln	gtc Val	aag Lys 265	ggc Gly	ttc Phe	gct Ala	gga Gly	ttc Phe 270	cca Pro	gta Val	816
tcc Ser	ggc Gly	ctg Leu 275	tgg Trp	ctt Leu	cg Arg	tgc Cys	acc Thr 280	aac Asn	gag Glu	gaa Glu	ctg Leu	atc Ile 285	gag Glu	cag Gln	cac His	864
gca Ala 290	gcc Ala	aag Lys	gta Val	tat Tyr	ggc Gly	aag Lys 295	gca Ala	tct Ser	ggt Val	ggc Gly	gct Ala 300	cct Pro	cca Pro	atg Met	tct Ser	912
ggt Val 305	cct Pro	cac His	ctt Leu	gac Asp	acc Thr 310	cg Arg	ggt Val	atc Ile	gag Glu	ggt Gly 315	gaa Glu	aag Lys	ggt Gly	ctg Leu	ctc Leu 320	960
ttt Phe	gga Gly	cct Pro	tac Tyr	ggt Gly 325	ggc Gly	tgg Trp	acc Thr	cct Pro	aag Lys 330	ttc Phe	ttg Leu	aag Lys	gaa Glu	ggc Gly 335	tcc Ser	1008

ES 2 500 365 T3

tac ctg gac ctg ttc aag tcc atc cgc cca gac aac att cct tcc tac 1056
 Tyr Leu Asp Leu Phe Lys Ser Ile Arg Pro Asp Asn Ile Pro Ser Tyr
 340 345 350
 ctt ggc gtt gct gct cag gaa ttt gat ctg acc aag tac ctt gtc act 1104
 Leu Gly Val Ala Ala Gln Glu Phe Asp Leu Thr Lys Tyr Leu Val Thr
 355 360 365
 gaa gtt ctc aag gac cag gac aag cgt atg gat gct ctt cgc gag tac 1152
 Glu Val Leu Lys Asp Gln Asp Lys Arg Met Asp Ala Leu Arg Glu Tyr
 370 375 380
 atg cca gag gca caa aac ggc gat tgg gag acc atc gtt gcc gga cag 1200
 Met Pro Glu Ala Gln Asn Gly Asp Trp Glu Thr Ile Val Ala Gly Gln
 385 390 395 400
 cgt gtt cag gtt att aag cct gca gga ttc cct aag ttc ggt tcc ctg 1248
 Arg Val Gln Val Ile Lys Pro Ala Gly Phe Pro Lys Phe Gly Ser Leu
 405 410 415
 gaa ttc ggc acc acc ttg atc aac aac tcc gaa ggc acc atc gcc gga 1296
 Glu Phe Gly Thr Thr Leu Ile Asn Asn Ser Glu Gly Thr Ile Ala Gly
 420 425 430
 ttg ctc ggt gct tcc cct gga gca tcc atc gca cct tcc gca atg atc 1344
 Leu Leu Gly Ala Ser Pro Gly Ala Ser Ile Ala Pro Ser Ala Met Ile
 435 440 445
 gag ctg ctt gag cgt tgc ttc ggt gac cgc atg atc gag tgg ggc gac 1392
 Glu Leu Leu Glu Arg Cys Phe Gly Asp Arg Met Ile Glu Trp Gly Asp
 450 455 460
 aag ctg aag gac atg atc cct tcc tac ggc aag aag ctt gct tcc gag 1440
 Lys Leu Lys Asp Met Ile Pro Ser Tyr Gly Lys Lys Leu Ala Ser Glu
 465 470 475 480
 cca gca ctg ttt gag cag cag tgg gca cgc acc cag aag acc ctg aag 1488
 Pro Ala Leu Phe Glu Gln Gln Trp Ala Arg Thr Gln Lys Thr Leu Lys
 485 490 495
 ctt gag gaa gcc taa 1503
 Leu Glu Glu Ala 500

<210> 8

<211> 500

<212> PRT

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 8

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

ES 2 500 365 T3

Gly His Ser Ala Leu Cys Glu Leu Asn Tyr Thr Pro Glu Val Lys Gly
 65 70 75 80
 Lys Val Glu Ile Ala Lys Ala Val Gly Ile Asn Glu Lys Phe Gln Val
 85 90
 Ser Arg Gln Phe Trp Ser His Leu Val Glu Glu Gly Val Leu Ala Asp
 100 105 110
 Pro Lys Glu Phe Ile Asn Pro Val Pro His Val Ser Phe Gly Gln Gly
 115 120 125
 Ala Asp Gln Val Ala Tyr Ile Lys Ala Arg Tyr Glu Ala Leu Lys Asp
 130 135 140
 His Pro Leu Phe Gln Gly Met Thr Tyr Ala Asp Asp Glu Ala Thr Phe
 145 150 155 160
 Thr Glu Lys Leu Pro Leu Met Ala Lys Gly Arg Asp Phe Ser Asp Pro
 165 170 175
 Val Ala Ile Ser Trp Ile Asp Glu Gly Thr Asp Ile Asn Tyr Gly Ala
 180 185 190
 Gln Thr Lys Gln Tyr Leu Asp Ala Ala Glu Val Glu Gly Thr Glu Ile
 195 200 205
 Arg Tyr Gly His Glu Val Lys Ser Ile Lys Ala Asp Gly Ala Lys Trp
 210 215 220
 Ile Val Thr Val Lys Asn Val His Thr Gly Asp Thr Lys Thr Ile Lys
 225 230 235 240
 Ala Asn Phe Val Phe Val Gly Ala Gly Gly Tyr Ala Leu Asp Leu Leu
 245 250 255
 Arg Ser Ala Gly Ile Pro Gln Val Lys Gly Phe Ala Gly Phe Pro Val
 260 265 270
 Ser Gly Leu Trp Leu Arg Cys Thr Asn Glu Glu Leu Ile Glu Gln His
 275 280 285
 Ala Ala Lys Val Tyr Gly Lys Ala Ser Val Gly Ala Pro Pro Met Ser
 290 295 300
 Val Pro His Leu Asp Thr Arg Val Ile Glu Gly Glu Lys Gly Leu Leu
 305 310 315 320
 Phe Gly Pro Tyr Gly Gly Trp Thr Pro Lys Phe Leu Lys Glu Gly Ser
 325 330 335
 Tyr Leu Asp Leu Phe Lys Ser Ile Arg Pro Asp Asn Ile Pro Ser Tyr

ES 2 500 365 T3

atg Met 1	tca Ser	gat Asp	tcc Ser	ccg Pro 5	aag Lys	aac Asn	gca Ala	ccg Pro	agg Arg 10	att Ile	acc Thr	gat Asp	gag Glu	gca Ala 15	gat Asp	48
gta Val	gtt Val	ctc Leu	att Ile 20	ggt Gly	gcc Ala	ggt Gly	atc Ile	atg Met 25	agc Ser	tcc Ser	acg Thr	ctg Leu	ggt Gly 30	gca Ala	atg Met	96
ctg Leu	cg Arg	cag Gln 35	ctg Leu	gag Glu	cca Pro	agc Ser	tgg Trp 40	act Thr	cag Gln	atc Ile	gtc Val	ttc Phe 45	gag Glu	cg Arg	ttg Leu	144
gat Asp	gga Gly 50	ccg Pro	gca Ala	caa Gln	gag Glu	tcg Ser 55	tcc Ser	tcc Ser	ccg Pro	tgg Trp	aac Asn 60	aat Asn	gca Ala	gga Gly	acc Thr	192
ggc Gly 65	cac His	tct Ser	gct Ala	cta Leu	tgc Cys 70	gag Glu	ctg Leu	aac Asn	tac Tyr	acc Thr 75	cca Pro	gag Glu	ggt Val	aag Lys	ggc Gly 80	240
aag Lys	gtt Val	gaa Glu	att Ile	gcc Ala 85	aag Lys	gct Ala	gta Val	gga Gly	atc Ile 90	aac Asn	gag Glu	aag Lys	ttc Phe 95	cag Gln	ggt Val	288
tcc Ser	cg Arg	cag Gln	ttc Phe 100	tgg Trp	tct Ser	cac His	ctc Leu	ggt Val 105	gaa Glu	gag Glu	gga Gly	gtg Val	ctg Leu 110	gct Ala	gat Asp	336
cct Pro	aag Lys	gaa Glu 115	ttc Phe	atc Ile	aac Asn	cct Pro	gtt Val 120	cct Pro	cac His	gta Val	tct Ser	ttc Phe 125	ggc Gly	cag Gln	ggc Gly	384
gca Ala	gat Asp 130	cag Gln	ggt Val	gca Ala	tac Tyr	atc Ile 135	aag Lys	gct Ala	cg Arg	tac Tyr	gaa Glu 140	gct Ala	ttg Leu	aag Lys	gat Asp	432
cac His 145	cca Pro	ctc Leu	ttc Phe	cag Gln	ggc Gly 150	atg Met	acc Thr	tac Tyr	gct Ala	gac Asp 155	gat Asp	gaa Glu	gct Ala	acc Thr	ttc Phe 160	480
acc Thr	gag Glu	aag Lys	ctg Leu	cct Pro 165	ttg Leu	atg Met	gca Ala	aag Lys	ggc Gly 170	cg Arg	gac Asp	ttc Phe	tct Ser	gat Asp 175	cca Pro	528
gta Val	gca Ala	atc Ile	tct Ser 180	tgg Trp	atc Ile	gat Asp	gaa Glu	ggc Gly 185	acc Thr	gac Asp	atc Ile	aac Asn	tac Tyr 190	ggt Gly	gct Ala	576
cag Gln	acc Thr	aag Lys 195	cag Gln	tac Tyr	ctg Leu	gat Asp	gca Ala 200	tct Ser	gaa Glu	ggt Val	gaa Glu	ggc Gly 205	act Thr	gaa Glu	atc Ile	624
cg Arg	tat Tyr 210	ggc Gly	cac His	gaa Glu	gtc Val	aag Lys 215	agc Ser	atc Ile	aag Lys	gct Ala	gat Asp 220	ggc Gly	gca Ala	aag Lys	tgg Trp	672
atc Ile 225	gtg Val	acc Thr	gtc Val	aag Lys	aac Asn 230	gta Val	cac His	act Thr	ggc Gly	gac Asp 235	acc Thr	aag Lys	acc Thr	atc Ile	aag Lys 240	720
gca Ala	aac Asn	ttc Phe	gtg Val	ttc Phe 245	gtc Val	ggc Gly	gca Ala	ggc Gly	gga Gly 250	tac Tyr	gca Ala	ctg Leu	gat Asp	ctg Leu 255	ctt Leu	768
cg Arg	agc Ser	gca Ala	ggc Gly 260	atc Ile	cca Pro	cag Gln	gtc Val	aag Lys 265	ggc Gly	ttc Phe	gct Ala	gga Gly	ttc Phe 270	cca Pro	gta Val	816
tcc Ser	ggc Gly	ctg Leu 275	tgg Trp	ctt Leu	cg Arg	tgc Cys	acc Thr 280	aac Asn	gag Glu	gaa Glu	ctg Leu	atc Ile 285	gag Glu	cag Gln	cac His	864

ES 2 500 365 T3

gca gcc aag gta tat ggc aag gca tct gtt ggc gct cct cca atg tct 912
Ala Ala Lys Val Tyr Gly Lys Ala Ser Val Gly Ala Pro Pro Met Ser
290 295 300

gtt cct cac ctt gac acc cgc gtt atc gag ggt gaa aag ggt ctg ctc 960
Val Pro His Leu Asp Thr Arg Val Ile Glu Gly Glu Lys Gly Leu Leu
305 310 315 320

ttt gga cct tac ggt ggc tgg acc cct aag ttc ttg aag gaa ggc tcc 1008
Phe Gly Pro Tyr Gly Gly Trp Thr Pro Lys Phe Leu Lys Glu Gly Ser
325 330 335

tac ctg gac ctg ttc aag tcc atc cgc cca gac aac att cct tcc tac 1056
Tyr Leu Asp Leu Phe Lys Ser Ile Arg Pro Asp Asn Ile Pro Ser Tyr
340 345 350

ctt ggc gtt gct gct cag gaa ttt gat ctg acc aag tac ctt gtc act 1104
Leu Gly Val Ala Ala Gln Glu Phe Asp Leu Thr Lys Tyr Leu Val Thr
355 360 365

gaa gtt ctc aag gac cag gac aag cgt atg gat gct ctt cgc gag tac 1152
Glu Val Leu Lys Asp Gln Asp Lys Arg Met Asp Ala Leu Arg Glu Tyr
370 375 380

atg cca gag gca caa aac ggc gat tgg gag acc atc gtt gcc gga cag 1200
Met Pro Glu Ala Gln Asn Gly Asp Trp Glu Thr Ile Val Ala Gly Gln
385 390 395 400

cgt gtt cag gtt att aag cct gca gga ttc cct aag ttc ggt tcc ctg 1248
Arg Val Gln Val Ile Lys Pro Ala Gly Phe Pro Lys Phe Gly Ser Leu
405 410 415

gaa ttc ggc acc acc ttg atc aac aac tcc gaa ggc acc atc gcc gga 1296
Glu Phe Gly Thr Thr Leu Ile Asn Asn Ser Glu Gly Thr Ile Ala Gly
420 425 430

ttg ctc ggt gct tcc cct gga gca tcc atc gca cct tcc gca atg atc 1344
Leu Leu Gly Ala Ser Pro Gly Ala Ser Ile Ala Pro Ser Ala Met Ile
435 440 445

gag ctg ctt gag cgt tgc ttc ggt gac cgc atg atc gag tgg ggc gac 1392
Glu Leu Leu Glu Arg Cys Phe Gly Asp Arg Met Ile Glu Trp Gly Asp
450 455 460

aag ctg aag gac atg atc cct tcc tac ggc aag aag ctt gct tcc gag 1440
Lys Leu Lys Asp Met Ile Pro Ser Tyr Gly Lys Lys Leu Ala Ser Glu
465 470 475 480

cca gca ctg ttt gag cag cag tgg gca cgc acc cag aag acc ctg aag 1488
Pro Ala Leu Phe Glu Gln Gln Trp Ala Arg Thr Gln Lys Thr Leu Lys
485 490 495

ctt gag gaa gcc taa 1503
Leu Glu Glu Ala
500

<210> 10

<211> 500

<212> PRT

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 10

Met Ser Asp Ser Pro Lys Asn Ala Pro Arg Ile Thr Asp Glu Ala Asp
1 5 10 15

Val Val Leu Ile Gly Ala Gly Ile Met Ser Ser Thr Leu Gly Ala Met

Val Pro His Leu Asp Thr Arg Val Ile Glu Gly Glu Lys Gly Leu Leu
 305 310 315 320
 Phe Gly Pro Tyr Gly Gly Trp Thr Pro Lys Phe Leu Lys Glu Gly Ser
 325 330 335
 Tyr Leu Asp Leu Phe Lys Ser Ile Arg Pro Asp Asn Ile Pro Ser Tyr
 340 345 350
 Leu Gly Val Ala Ala Gln Glu Phe Asp Leu Thr Lys Tyr Leu Val Thr
 355 360 365
 Glu Val Leu Lys Asp Gln Asp Lys Arg Met Asp Ala Leu Arg Glu Tyr
 370 375 380
 Met Pro Glu Ala Gln Asn Gly Asp Trp Glu Thr Ile Val Ala Gly Gln
 385 390 395 400
 Arg Val Gln Val Ile Lys Pro Ala Gly Phe Pro Lys Phe Gly Ser Leu
 405 410 415
 Glu Phe Gly Thr Thr Leu Ile Asn Asn Ser Glu Gly Thr Ile Ala Gly
 420 425 430
 Leu Leu Gly Ala Ser Pro Gly Ala Ser Ile Ala Pro Ser Ala Met Ile
 435 440 445
 Glu Leu Leu Glu Arg Cys Phe Gly Asp Arg Met Ile Glu Trp Gly Asp
 450 455 460
 Lys Leu Lys Asp Met Ile Pro Ser Tyr Gly Lys Lys Leu Ala Ser Glu
 465 470 475 480
 Pro Ala Leu Phe Glu Gln Gln Trp Ala Arg Thr Gln Lys Thr Leu Lys
 485 490 495
 Leu Glu Glu Ala
 500

<210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> cebador mqo-start

10 <400> 11
 cagagaactc gcggagataa

ES 2 500 365 T3

<210> 12
 <211> 20
 <212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> cebador mqo-stop

10 <400> 12
aacctcaaca gacatgtgcg 20

<210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

15

<220>
 <223> cebador mqo-A1

20

<400> 13
 ggtgaaactt cgcgatact 20

<210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

25

<220>
 <223> cebador mqo-E1

30

<400> 14
 gtgtcgccta aatcacactg 20

35

<210> 15
 <211> 99
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

40

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (99)
 <223> marco de lectura

45

<220>
 <221> mutación
 <222> (49)..(51)
 <223> las posiciones 49 hasta 51 corresponden a las posiciones 331 hasta 333 de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5,
 SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9,

50

<220>
 <221> característica variada
 <222> (49)..(51)
 <223> n e s a , c , g ó t

55

<400> 15

ES 2 500 365 T3

cag gtt tcc cgt cag ttc tgg tct cac ctc gtt gaa gag gga gtg ctg 48
Gln Val Ser Arg Gln Phe Trp Ser His Leu Val Glu Glu Gly Val Leu
1 5 10 15

nnn gat cct aag gaa ttc atc aac cct gtt cct cac gta tct ttc ggc 96
xaa asp pro lys glu phe ile asn pro val pro his val ser phe gly
20 25 30

cag 99
Gln

<210> 16
 <211> 33
 <212> PRT

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <221> característica variada
 <222> (17)..(17)

10 <223> El "xaa" en la posición 17 representa Lys, Asn, Arg, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys o Phe.

<400> 16

Gln Val Ser Arg Gln Phe Trp Ser His Leu Val Glu Glu Gly Val Leu
1 5 10 15

Xaa Asp Pro Lys Glu Phe Ile Asn Pro Val Pro His Val Ser Phe Gly
20 25 30

Gln

15 <210> 17
 <211> 99
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

20 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(99)
 <223> marco de lectura

25 <220>
 <221> mutación
 <222> (49)..(51)
 <223> las posiciones 49 hasta 51 corresponden a las posiciones 331 hasta 333 de la SEQ ID NO:5

<400> 17

cag gtt tcc cgt cag ttc tgg tct cac ctc gtt gaa gag gga gtg ctg 48
Gln Val Ser Arg Gln Phe Trp Ser His Leu Val Glu Glu Gly Val Leu
1 5 10 15

ttt gat cct aag gaa ttc atc aac cct gtt cct cac gta tct ttc ggc 96
Phe Asp Pro Lys Glu Phe Ile Asn Pro Val Pro His Val Ser Phe Gly
20 25 30

cag 99
Gln

30 <210> 18
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

35 <400> 18

Gln val Ser Arg Gln Phe Trp Ser His Leu val Glu Glu Gly val Leu
 1 5 10 15
 Phe Asp Pro Lys Glu Phe Ile Asn Pro Val Pro His val Ser Phe Gly
 20 25 30

Gln

- <210> 19
- <211> 99
- 5 <212> ADN
- <213> Corynebacterium glutamicum

- <220>
- <221> CDS
- 10 <222> (1)..(99)
- <223> marco de lectura

- <220>
- <221> mutación
- 15 <222> (49)..(51)
- <223> las posiciones 49 hasta 51 corresponden a las posiciones 331 hasta 333 de la SEQ ID NO: 7 o de la SEQ ID NO: 9

<400> 19
 cag gtt tcc cgt cag ttc tgg tct cac ctc gtt gaa gag gga gtg ctg 48
 Gln Val Ser Arg Gln Phe Trp Ser His Leu Val Glu Glu Gly Val Leu
 1 5 10 15

gct gat cct aag gaa ttc atc aac cct gtt cct cac gta tct ttc ggc 96
 Ala Asp Pro Lys Glu Phe Ile Asn Pro Val Pro His Val Ser Phe Gly
 20 25 30

cag 99
 Gln

- 20 <210> 20
- <211> 33
- <212> PRT
- <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 20
 Gln val Ser Arg Gln Phe Trp Ser His Leu val Glu Glu Gly val Leu
 1 5 10 15

Ala Asp Pro Lys Glu Phe Ile Asn Pro Val Pro His Val Ser Phe Gly
 20 25 30

Gln

- 30 <210> 21
- <211> 1263
- <212> ADN
- <213> Corynebacterium glutamicum

- <220>
- <221> CDS
- 35 <222> (1)..(1263)
- <223> gen lysC del tipo silvestre

ES 2 500 365 T3

<400> 21

gtg Met 1	gcc Ala	ctg Leu	gtc Val	gta Val 5	cag Gln	aaa Lys	tat Tyr	ggc Gly	ggt Gly 10	tcc Ser	tcg Ser	ctt Leu	gag Glu	agt Ser 15	gcg Ala	48
gaa Glu	cgc Arg	att Ile	aga Arg 20	aac Asn	gtc Val	gct Ala	gaa Glu	cgg Arg 25	atc Ile	gtt Val	gcc Ala	acc Thr	aag Lys 30	aag Lys	gct Ala	96
gga Gly	aat Asn	gat Asp 35	gtc Val	gtg Val	gtt Val	gtc Val	tgc Cys 40	tcc Ser	gca Ala	atg Met	gga Gly	gac Asp 45	acc Thr	acg Thr	gat Asp	144
gaa Glu	ctt Leu 50	cta Leu	gaa Glu	ctt Leu	gca Ala	gcg Ala 55	gca Ala	gtg Val	aat Asn	ccc Pro	gtt Val 60	ccg Pro	cca Pro	gct Ala	cgt Arg	192
gaa Glu 65	atg Met	gat Asp	atg Met	ctc Leu	ctg Leu 70	act Thr	gct Ala	ggt Gly	gag Glu	cgt Arg 75	att Ile	tct Ser	aac Asn	gct Ala	ctc Leu 80	240
gtc Val	gcc Ala	atg Met	gct Ala	att Ile 85	gag Glu	tcc Ser	ctt Leu	ggc Gly	gca Ala 90	gaa Glu	gcc Ala	caa Gln	tct Ser	ttc Phe 95	acg Thr	288
ggc Gly	tct Ser	cag Gln	gct Ala 100	ggt Gly	gtg Val	ctc Leu	acc Thr	acc Thr 105	gag Glu	cgc Arg	cac His	gga Gly	aac Asn 110	gca Ala	cgc Arg	336
att Ile	gtt Val	gat Asp 115	gtc Val	act Thr	cca Pro	ggt Gly	cgt Arg 120	gtg Val	cgt Arg	gaa Glu	gca Ala	ctc Leu 125	gat Asp	gag Glu	ggc Gly	384
aag Lys	atc Ile 130	tgc Cys	att Ile	gtt Val	gct Ala	ggt Gly 135	ttc Phe	cag Gln	ggt Gly	gtt Val	aat Asn 140	aaa Lys	gaa Glu	acc Thr	cgc Arg	432
gat Asp 145	gtc Val	acc Thr	acg Thr	ttg Leu	ggt Gly 150	cgt Arg	ggt Gly	ggt Gly	tct Ser	gac Asp 155	acc Thr	act Thr	gca Ala	gtt Val	gcg Ala 160	480
ttg Leu	gca Ala	gct Ala	gct Ala	ttg Leu 165	aac Asn	gct Ala	gat Asp	gtg Val	tgt Cys 170	gag Glu	att Ile	tac Tyr	tcg Ser	gac Asp 175	gtt Val	528
gac Asp	ggt Gly	gtg Val	tat Tyr 180	acc Thr	gct Ala	gac Asp	ccg Pro	cgc Arg 185	atc Ile	gtt Val	cct Pro	aat Asn	gca Ala 190	cag Gln	aag Lys	576
ctg Leu	gaa Glu	aag Lys 195	ctc Leu	agc Ser	ttc Phe	gaa Glu	gaa Glu 200	atg Met	ctg Leu	gaa Glu	ctt Leu	gct Ala 205	gct Ala	gtt Val	ggc Gly	624
tcc Ser	aag Lys 210	att Ile	ttg Leu	gtg Val	ctg Leu	cgc Arg 215	agt Ser	gtt Val	gaa Glu	tac Tyr	gct Ala 220	cgf Arg	gca Ala	ttc Phe	aat Asn	672
gtg Val 225	cca Pro	ctt Leu	cgc Arg	gta Val 230	cgc Arg	tcg Ser	tct Ser	tat Tyr	agt Ser	aat Asn 235	gat Asp	ccc Pro	ggc Gly	act Thr	ttg Leu 240	720
att Ile	gcc Ala	ggc Gly	tct Ser	atg Met 245	gag Glu	gat Asp	att Ile	cct Pro	gtg Val 250	gaa Glu	gaa Glu	gca Ala	gtc Val	ctt Leu 255	acc Thr	768
ggt Gly	gtc Val	gca Ala	acc Thr 260	gac Asp	aag Lys	tcc Ser	gaa Glu	gcc Ala 265	aaa Lys	gta Val	acc Thr	gtt Val	ctg Leu 270	ggt Gly	att Ile	816

ES 2 500 365 T3

tcc gat aag cca ggc gag gct gcg aag gtt ttc cgt gcg ttg gct gat 864
 Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp
 275 280 285

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 1263
 420

<210> 22

<211> 421

<212> PRT

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 22

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

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

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

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

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

ES 2 500 365 T3

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

ES 2 500 365 T3

Pro	Lys	Glu	Phe	Ile	Asn	Pro	Val	Pro	His	Val	Ser	Phe	Gly	Gln	Gly		
		115					120					125					
gca	gat	cag	ggt	gca	tac	atc	aag	gct	cgc	tac	gaa	gct	ttg	aag	gat		432
Ala	Asp	Gln	Val	Ala	Tyr	Ile	Lys	Ala	Arg	Tyr	Glu	Ala	Leu	Lys	Asp		
		130				135					140						
cac	cca	ctc	ttc	cag	ggc	atg	acc	tac	gct	gac	gat	gaa	gct	acc	ttc		480
His	Pro	Leu	Phe	Gln	Gly	Met	Thr	Tyr	Ala	Asp	Asp	Glu	Ala	Thr	Phe		
					150					155					160		
acc	gag	aag	ctg	cct	ttg	atg	gca	aag	ggc	cgt	gac	ttc	tct	gat	cca		528
Thr	Glu	Lys	Leu	Pro	Leu	Met	Ala	Lys	Gly	Arg	Asp	Phe	Ser	Asp	Pro		
				165					170					175			
gta	gca	atc	tct	tgg	atc	gat	gaa	ggc	acc	gac	atc	aac	tac	ggt	gct		576
Val	Ala	Ile	Ser	Trp	Ile	Asp	Glu	Gly	Thr	Asp	Ile	Asn	Tyr	Gly	Ala		
			180					185					190				
cag	acc	aag	cag	tac	ctg	gat	gca	gct	gaa	ggt	gaa	ggc	act	gaa	atc		624
Gln	Thr	Lys	Gln	Tyr	Leu	Asp	Ala	Ala	Glu	Val	Glu	Gly	Thr	Glu	Ile		
		195					200					205					
cgc	tat	ggc	cac	gaa	gtc	aag	agc	atc	aag	gct	gat	ggc	gca	aag	tgg		672
Arg	Tyr	Gly	His	Glu	Val	Lys	Ser	Ile	Lys	Ala	Asp	Gly	Ala	Lys	Trp		
	210					215					220						
atc	gtg	acc	gtc	aag	aac	gta	cac	act	ggc	gac	acc	aag	acc	atc	aag		720
Ile	Val	Thr	Val	Lys	Asn	Val	His	Thr	Gly	Asp	Thr	Lys	Thr	Ile	Lys		
					230					235					240		
gca	aac	ttc	gtg	ttc	gtc	ggc	gca	ggc	gga	tac	gca	ctg	gat	ctg	ctt		768
Ala	Asn	Phe	Val	Phe	Val	Gly	Ala	Gly	Gly	Tyr	Ala	Leu	Asp	Leu	Leu		
				245				250						255			
cgc	agc	gca	ggc	atc	cca	cag	gtc	aag	ggc	ttc	gct	gga	ttc	cca	gta		816
Arg	Ser	Ala	Gly	Ile	Pro	Gln	Val	Lys	Gly	Phe	Ala	Gly	Phe	Pro	Val		
			260					265					270				
tcc	ggc	ctg	tgg	ctt	cgt	tgc	acc	aac	gag	gaa	ctg	atc	gag	cag	cac		864
Ser	Gly	Leu	Trp	Leu	Arg	Cys	Thr	Asn	Glu	Glu	Leu	Ile	Glu	Gln	His		
		275					280					285					
gca	gcc	aag	gta	tat	ggc	aag	gca	tct	ggt	ggc	gct	cct	cca	atg	tct		912
Ala	Ala	Lys	Val	Tyr	Gly	Lys	Ala	Ser	Val	Gly	Ala	Pro	Pro	Met	Ser		
	290					295				300							
ggt	cct	cac	ctt	gac	acc	cgc	ggt	atc	gag	ggt	gaa	aag	ggt	ctg	ctc		960
Val	Pro	His	Leu	Asp	Thr	Arg	Val	Ile	Glu	Gly	Glu	Lys	Gly	Leu	Leu		
				310						315					320		
ttt	gga	cct	tac	ggt	ggc	tgg	acc	cct	aag	ttc	ttg	aag	gaa	ggc	tcc		1008
Phe	Gly	Pro	Tyr	Gly	Gly	Trp	Thr	Pro	Lys	Phe	Leu	Lys	Glu	Gly	Ser		
				325					330					335			
tac	ctg	gac	ctg	ttc	aag	tcc	atc	cgc	cca	gac	aac	att	cct	tcc	tac		1056
Tyr	Leu	Asp	Leu	Phe	Lys	Ser	Ile	Arg	Pro	Asp	Asn	Ile	Pro	Ser	Tyr		
			340					345					350				
ctt	ggc	ggt	gct	gct	cag	gaa	ttt	gat	ctg	acc	aag	tac	ctt	gtc	act		1104
Leu	Gly	Val	Ala	Ala	Gln	Glu	Phe	Asp	Leu	Thr	Lys	Tyr	Leu	Val	Thr		
		355					360					365					
gaa	ggt	ctc	aag	gac	cag	gac	aag	cgt	atg	gat	gct	ctt	cgc	gag	tac		1152
Glu	Val	Leu	Lys	Asp	Gln	Asp	Lys	Arg	Met	Asp	Ala	Leu	Arg	Glu	Tyr		
		370				375					380						
atg	cca	gag	gca	caa	nnn	ggc	gat	tgg	gag	acc	atc	ggt	gcc	gga	cag		1200
Met	Pro	Glu	Ala	Gln	Xaa	Gly	Asp	Trp	Glu	Thr	Ile	Val	Ala	Gly	Gln		

ES 2 500 365 T3

385		390		395		400	
cgt gtt cag gtt att aag cct gca gga ttc cct aag ttc ggt tcc ctg							1248
Arg Val Gln Val Ile Lys Pro Ala Gly Phe Pro Lys Phe Gly Ser Leu		405		410		415	
gaa ttc ggc acc acc ttg atc aac aac tcc gaa ggc acc atc gcc gga							1296
Glu Phe Gly Thr Thr Leu Ile Asn Asn Ser Glu Gly Thr Ile Ala Gly		420		425		430	
ttg ctc ggt gct tcc cct gga gca tcc atc gca cct tcc gca atg atc							1344
Leu Leu Gly Ala Ser Pro Gly Ala Ser Ile Ala Pro Ser Ala Met Ile		435		440		445	
gag ctg ctt gag cgt tgc ttc ggt gac cgc atg atc gag tgg ggc gac							1392
Glu Leu Leu Glu Arg Cys Phe Gly Asp Arg Met Ile Glu Trp Gly Asp		450		455		460	
aag ctg aag gac atg atc cct tcc tac ggc aag aag ctt gct tcc gag							1440
Lys Leu Lys Asp Met Ile Pro Ser Tyr Gly Lys Lys Leu Ala Ser Glu		465		470		475	480
cca gca ctg ttt gag cag cag tgg gca cgc acc cag aag acc ctg aag							1488
Pro Ala Leu Phe Glu Gln Gln Trp Ala Arg Thr Gln Lys Thr Leu Lys		485		490		495	
ctt gag gaa gcc taa							1503
Leu Glu Glu Ala		500					

<210> 24

<211> 500

<212> PRT

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> característica variada

<222> (390)..(390)

10 <223> El "xaa" en la posición 390 representa Lys, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys o Phe.

<400> 24

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

15

ES 2 500 365 T3

Ser Arg Gln Phe Trp Ser His Leu Val Glu Glu Gly Val Leu Ser Asp
 100 105 110

Pro Lys Glu Phe Ile Asn Pro Val Pro His Val Ser Phe Gly Gln Gly
 115 120 125

Ala Asp Gln Val Ala Tyr Ile Lys Ala Arg Tyr Glu Ala Leu Lys Asp
 130 135 140

His Pro Leu Phe Gln Gly Met Thr Tyr Ala Asp Asp Glu Ala Thr Phe
 145 150 155 160

Thr Glu Lys Leu Pro Leu Met Ala Lys Gly Arg Asp Phe Ser Asp Pro
 165 170 175

Val Ala Ile Ser Trp Ile Asp Glu Gly Thr Asp Ile Asn Tyr Gly Ala
 180 185 190

Gln Thr Lys Gln Tyr Leu Asp Ala Ala Glu Val Glu Gly Thr Glu Ile
 195 200 205

Arg Tyr Gly His Glu Val Lys Ser Ile Lys Ala Asp Gly Ala Lys Trp
 210 215 220

Ile Val Thr Val Lys Asn Val His Thr Gly Asp Thr Lys Thr Ile Lys
 225 230 235 240

Ala Asn Phe Val Phe Val Gly Ala Gly Tyr Ala Leu Asp Leu Leu
 245 250 255

Arg Ser Ala Gly Ile Pro Gln Val Lys Gly Phe Ala Gly Phe Pro Val
 260 265 270

Ser Gly Leu Trp Leu Arg Cys Thr Asn Glu Glu Leu Ile Glu Gln His
 275 280 285

Ala Ala Lys Val Tyr Gly Lys Ala Ser Val Gly Ala Pro Pro Met Ser
 290 295 300

Val Pro His Leu Asp Thr Arg Val Ile Glu Gly Glu Lys Gly Leu Leu
 305 310 315 320

Phe Gly Pro Tyr Gly Gly Trp Thr Pro Lys Phe Leu Lys Glu Gly Ser
 325 330 335

Tyr Leu Asp Leu Phe Lys Ser Ile Arg Pro Asp Asn Ile Pro Ser Tyr
 340 345 350

Leu Gly Val Ala Ala Gln Glu Phe Asp Leu Thr Lys Tyr Leu Val Thr
 355 360 365

Glu Val Leu Lys Asp Gln Asp Lys Arg Met Asp Ala Leu Arg Glu Tyr

370 375 380

Met Pro Glu Ala Gln Xaa Gly Asp Trp Glu Thr Ile Val Ala Gly Gln
 385 390 395 400

Arg Val Gln Val Ile Lys Pro Ala Gly Phe Pro Lys Phe Gly Ser Leu
 405 410 415

Glu Phe Gly Thr Thr Leu Ile Asn Asn Ser Glu Gly Thr Ile Ala Gly
 420 425 430

Leu Leu Gly Ala Ser Pro Gly Ala Ser Ile Ala Pro Ser Ala Met Ile
 435 440 445

Glu Leu Leu Glu Arg Cys Phe Gly Asp Arg Met Ile Glu Trp Gly Asp
 450 455 460

Lys Leu Lys Asp Met Ile Pro Ser Tyr Gly Lys Lys Leu Ala Ser Glu
 465 470 475 480

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

Leu Glu Glu Ala
 500

<210> 25
 <211> 1503
 <212> ADN
 5 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1500)
 10 <223> alelo de mqo

<220>
 <221> mutación
 <222> (1168)..(1170)

15 <400> 25

atg tca gat tcc ccg aag aac gca ccg agg att acc gat gag gca gat	48
Met Ser Asp Ser Pro Lys Asn Ala Pro Arg Ile Thr Asp Glu Ala Asp	
1 5 10 15	
gta gtt ctc att ggt gcc ggt atc atg agc tcc acg ctg ggt gca atg	96
Val Val Leu Ile Gly Ala Gly Ile Met Ser Ser Thr Leu Gly Ala Met	
20 25 30	
ctg cgt cag ctg gag cca agc tgg act cag atc gtc ttc gag cgt ttg	144
Leu Arg Gln Leu Glu Pro Ser Trp Thr Gln Ile Val Phe Glu Arg Leu	
35 40 45	
gat gga ccg gca caa gag tcg tcc tcc ccg tgg aac aat gca gga acc	192
Asp Gly Pro Ala Gln Glu Ser Ser Ser Pro Trp Asn Asn Ala Gly Thr	
50 55 60	
ggc cac tct gct cta tgc gag ctg aac tac acc cca gag gtt aag ggc	240

ES 2 500 365 T3

Gly 65	His	Ser	Ala	Leu	Cys 70	Glu	Leu	Asn	Tyr	Thr 75	Pro	Glu	Val	Lys	Gly 80	
aag Lys	ggt Val	gaa Glu	att Ile	gcc Ala 85	aag Lys	gct Ala	gta Val	gga Gly	atc Ile 90	aac Asn	gag Glu	aag Lys	ttc Phe	cag Gln 95	ggt Val	288
tcc Ser	cgt Arg	cag Gln	ttc Phe 100	tgg Trp	tct Ser	cac His	ctc Leu	ggt Val 105	gaa Glu	gag Glu	gga Gly	gtg Val	ctg Leu 110	tct Ser	gat Asp	336
cct Pro	aag Lys	gaa Glu 115	ttc Phe	atc Ile	aac Asn	cct Pro	ggt Val 120	cct Pro	cac His	gta Val	tct Ser	ttc Phe 125	ggc Gly	cag Gln	ggc Gly	384
gca Ala	gat Asp 130	cag Gln	ggt Val	gca Ala	tac Tyr	atc Ile 135	aag Lys	gct Ala	cgc Arg	tac Tyr	gaa Glu 140	gct Ala	ttg Leu	aag Lys	gat Asp	432
cac His 145	ccc Pro	ctc Leu	ttc Phe	cag Gln	ggc Gly 150	atg Met	acc Thr	tac Tyr	gct Ala	gac Asp 155	gat Asp	gaa Glu	gct Ala	acc Thr	ttc Phe 160	480
acc Thr	gag Glu	aag Lys	ctg Leu	cct Pro 165	ttg Leu	atg Met	gca Ala	aag Lys	ggc Gly 170	cgt Arg	gac Asp	ttc Phe	tct Ser	gat Asp 175	cca Pro	528
gta Val	gca Ala	atc Ile	tct Ser 180	tgg Trp	atc Ile	gat Asp	gaa Glu	ggc Gly 185	acc Thr	gac Asp	atc Ile	aac Asn	tac Tyr 190	ggt Gly	gct Ala	576
cag Gln	acc Thr	aag Lys 195	cag Gln	tac Tyr	ctg Leu	gat Asp	gca Ala 200	gct Ala	gaa Glu	ggt Val	gaa Glu	ggc Gly 205	act Thr	gaa Glu	atc Ile	624
cgc Arg	tat Tyr 210	ggc Gly	cac His	gaa Glu	gtc Val	aag Lys 215	agc Ser	atc Ile	aag Lys	gct Ala	gat Asp 220	ggc Gly	gca Ala	aag Lys	tgg Trp	672
atc Ile 225	gtg Val	acc Thr	gtc Val	aag Lys	aac Asn 230	gta Val	cac His	act Thr	ggc Gly	gac Asp 235	acc Thr	aag Lys	acc Thr	atc Ile	aag Lys 240	720
gca Ala	aac Asn	ttc Phe	gtg Val	ttc Phe 245	gtc Val	ggc Gly	gca Ala	ggc Gly	gga Gly 250	tac Tyr	gca Ala	ctg Leu	gat Asp	ctg Leu 255	ctt Leu	768
cgc Arg	agc Ser	gca Ala	ggc Gly 260	atc Ile	cca Pro	cag Gln	gtc Val	aag Lys 265	ggc Gly	ttc Phe	gct Ala	gga Gly	ttc Phe 270	cca Pro	gta Val	816
tcc Ser	ggc Gly	ctg Leu 275	tgg Trp	ctt Leu	cgt Arg	tgc Cys	acc Thr 280	aac Asn	gag Glu	gaa Glu	ctg Leu	atc Ile 285	gag Glu	cag Gln	cac His	864
gca Ala	gcc Ala 290	aag Lys	gta Val	tat Tyr	ggc Gly 295	aag Lys 295	gca Ala	tct Ser	ggt Val	ggc Gly 300	gct Ala	cct Pro	cca Pro	atg Met	tct Ser	912
ggt Val 305	cct Pro	cac His	ctt Leu	gac Asp	acc Thr 310	cgc Arg	ggt Val	atc Ile	gag Glu	ggt Gly 315	gaa Glu	aag Lys	ggt Gly	ctg Leu	ctc Leu 320	960
ttt Phe	gga Gly	cct Pro	tac Tyr	ggt Gly 325	ggc Gly	tgg Trp	acc Thr	cct Pro	aag Lys 330	ttc Phe	ttg Leu	aag Lys	gaa Glu	ggc Gly 335	tcc Ser	1008
tac Tyr	ctg Leu	gac Asp	ctg Leu	ttc Phe	aag Lys	tcc Ser	atc Ile	cgc Arg	cca Pro	gac Asp	aac Asn	att Ile	cct Pro	tcc Ser	tac Tyr	1056

ES 2 500 365 T3

	340		345		350		
ctt ggc gtt gct gct cag gaa ttt gat ctg acc aag tac ctt gtc act							1104
Leu Gly Val Ala Ala Gln Glu Phe Asp Leu Thr Lys Tyr Leu Val Thr		355			360	365	
gaa gtt ctc aag gac cag gac aag cgt atg gat gct ctt cgc gag tac							1152
Glu Val Leu Lys Asp Gln Asp Lys Arg Met Asp Ala Leu Arg Glu Tyr		370			375	380	
atg cca gag gca caa tac ggc gat tgg gag acc atc gtt gcc gga cag							1200
Met Pro Glu Ala Gln Tyr Gly Asp Trp Glu Thr Ile Val Ala Gly Gln				390		395	400
cgt gtt cag gtt att aag cct gca gga ttc cct aag ttc ggt tcc ctg							1248
Arg Val Gln Val Ile Lys Pro Ala Gly Phe Pro Lys Phe Gly Ser Leu			405			410	415
gaa ttc ggc acc acc ttg atc aac aac tcc gaa ggc acc atc gcc gga							1296
Glu Phe Gly Thr Thr Leu Ile Asn Asn Ser Glu Gly Thr Ile Ala Gly			420			425	430
ttg ctc ggt gct tcc cct gga gca tcc atc gca cct tcc gca atg atc							1344
Leu Leu Gly Ala Ser Pro Gly Ala Ser Ile Ala Pro Ser Ala Met Ile			435			440	445
gag ctg ctt gag cgt tgc ttc ggt gac cgc atg atc gag tgg ggc gac							1392
Glu Leu Leu Glu Arg Cys Phe Gly Asp Arg Met Ile Glu Trp Gly Asp			450			455	460
aag ctg aag gac atg atc cct tcc tac ggc aag aag ctt gct tcc gag							1440
Lys Leu Lys Asp Met Ile Pro Ser Tyr Gly Lys Lys Leu Ala Ser Glu				470		475	480
cca gca ctg ttt gag cag cag tgg gca cgc acc cag aag acc ctg aag							1488
Pro Ala Leu Phe Glu Gln Gln Trp Ala Arg Thr Gln Lys Thr Leu Lys			485			490	495
ctt gag gaa gcc taa							1503
Leu Glu Glu Ala			500				

<210> 26

<211> 500

<212> PRT

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 26

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

Lys Val Glu Ile Ala Lys Ala Val Gly Ile Asn Glu Lys Phe Gln Val
 85 90 95
 Ser Arg Gln Phe Trp Ser His Leu Val Glu Glu Gly Val Leu Ser Asp
 100 105 110
 Pro Lys Glu Phe Ile Asn Pro Val Pro His Val Ser Phe Gly Gln Gly
 115 120 125
 Ala Asp Gln Val Ala Tyr Ile Lys Ala Arg Tyr Glu Ala Leu Lys Asp
 130 135 140
 His Pro Leu Phe Gln Gly Met Thr Tyr Ala Asp Asp Glu Ala Thr Phe
 145 150 155 160
 Thr Glu Lys Leu Pro Leu Met Ala Lys Gly Arg Asp Phe Ser Asp Pro
 165 170 175
 Val Ala Ile Ser Trp Ile Asp Glu Gly Thr Asp Ile Asn Tyr Gly Ala
 180 185 190
 Gln Thr Lys Gln Tyr Leu Asp Ala Ala Glu Val Glu Gly Thr Glu Ile
 195 200 205
 Arg Tyr Gly His Glu Val Lys Ser Ile Lys Ala Asp Gly Ala Lys Trp
 210 215 220
 Ile Val Thr Val Lys Asn Val His Thr Gly Asp Thr Lys Thr Ile Lys
 225 230 235 240
 Ala Asn Phe Val Phe Val Gly Ala Gly Gly Tyr Ala Leu Asp Leu Leu
 245 250 255
 Arg Ser Ala Gly Ile Pro Gln Val Lys Gly Phe Ala Gly Phe Pro Val
 260 265 270
 Ser Gly Leu Trp Leu Arg Cys Thr Asn Glu Glu Leu Ile Glu Gln His
 275 280 285
 Ala Ala Lys Val Tyr Gly Lys Ala Ser Val Gly Ala Pro Pro Met Ser
 290 295 300
 Val Pro His Leu Asp Thr Arg Val Ile Glu Gly Glu Lys Gly Leu Leu
 305 310 315 320
 Phe Gly Pro Tyr Gly Gly Trp Thr Pro Lys Phe Leu Lys Glu Gly Ser
 325 330 335
 Tyr Leu Asp Leu Phe Lys Ser Ile Arg Pro Asp Asn Ile Pro Ser Tyr
 340 345 350

Leu Gly Val Ala Ala Gln Glu Phe Asp Leu Thr Lys Tyr Leu Val Thr
 355 360 365
 Glu Val Leu Lys Asp Gln Asp Lys Arg Met Asp Ala Leu Arg Glu Tyr
 370 375 380
 Met Pro Glu Ala Gln Tyr Gly Asp Trp Glu Thr Ile Val Ala Gly Gln
 385 390 395 400
 Arg Val Gln Val Ile Lys Pro Ala Gly Phe Pro Lys Phe Gly Ser Leu
 405 410 415
 Glu Phe Gly Thr Thr Leu Ile Asn Asn Ser Glu Gly Thr Ile Ala Gly
 420 425 430
 Leu Leu Gly Ala Ser Pro Gly Ala Ser Ile Ala Pro Ser Ala Met Ile
 435 440 445
 Glu Leu Leu Glu Arg Cys Phe Gly Asp Arg Met Ile Glu Trp Gly Asp
 450 455 460
 Lys Leu Lys Asp Met Ile Pro Ser Tyr Gly Lys Lys Leu Ala Ser Glu
 465 470 475 480
 Pro Ala Leu Phe Glu Gln Gln Trp Ala Arg Thr Gln Lys Thr Leu Lys
 485 490 495

Leu Glu Glu Ala

<210> 27
 <211> 30
 <212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> cebador mqo-int1-bam

10 <400> 27
 ctaggatcc ccgaagaacg caccgaggat

30

<210> 28
 <211> 30
 <212> ADN

15 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> cebador mqo-int2-bam

20 <400> 28
 ctaggatcc ggcggatgga ctggaacagg

30

REIVINDICACIONES

1. Mutantes aislados de bacterias corineformes, que contienen un gen, escogido entre el conjunto que se compone de los siguientes a) hasta c):

5 a) un gen, que codifica un polipéptido con una actividad de malato-quinona oxidorreductasa, comprendiendo el polipéptido la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en cuyo caso está contenida L-fenilalanina en la posición 111 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y eventualmente está contenida L-serina en la posición 201 de la SEQ ID NO: 2;

10 b) un gen, que codifica un polipéptido con una actividad de malato-quinona oxidorreductasa, comprendiendo el polipéptido codificado una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en por lo menos un 98 % a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, estando contenida L-fenilalanina en la secuencia de aminoácidos en la posición, que corresponde a la posición 111 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;

15 c) un gen, que codifica una proteína con una actividad de malato-quinona oxidorreductasa, comprendiendo la proteína codificada una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 6, inclusive de uno a 5 intercambio(s) conservativo(s) de aminoácidos, estando contenida L-fenilalanina en la secuencia de aminoácidos en la posición, que corresponde a la posición 111 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;

20 siendo aumentada en por lo menos un 0,5 % la segregación de aminoácidos de estos mutantes, en comparación con la de una cepa de partida no mutagenizada con la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2.

25 2. Mutantes de bacterias corineformes de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizados por que 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*.

30 3. Mutantes de bacterias corineformes de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizados por que se trata de *Corynebacterium glutamicum*.

35 4. Mutantes de bacterias corineformes de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizados por que se trata de unas bacterias que segregan L-lisina o L-triptófano o L-prolina,

5. Mutantes de bacterias corineformes de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizados por que el gen comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5.

6. Un polinucleótido aislado escogido entre uno de los siguientes a) o b)

40 a) un polinucleótido, que codifica un polipéptido con una actividad enzimática de malato-quinona oxidorreductasa y con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, que contiene L-fenilalanina en la posición 111 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y eventualmente posee L-serina en la posición 201 de la SEQ ID NO: 2.

45 b) un polinucleótido, comprendiendo la proteína codificada una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 6 inclusive de uno a 5 intercambio(s) conservativo(s) de aminoácidos, estando contenida L-fenilalanina en la secuencia de aminoácidos, en la posición, que corresponde a la posición 111 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;

50 aumentando estos polinucleótidos en por lo menos un 0,5 % la secreción de aminoácidos de los correspondientes mutantes, en comparación con la de una cepa de partida no mutagenizada, con la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2,.

55 7. Polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado por que el polipéptido codificado con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 tiene una longitud de 500 aminoácidos, y está contenida L-fenilalanina en la posición 111 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

8. Polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado por que el polipéptido codificado comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

60 9. Polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado por que comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 5.

65 10. Un polinucleótido aislado, que comprende una molécula de ácido nucleico, que codifica por lo menos un marco de lectura con una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 95 hasta 127 de la SEQ ID NO: 2, estando contenida L-fenilalanina en la posición correspondiente a la posición 111 de la SEQ ID NO: 2, para la utilización para la producción de unas bacterias corineformes, que tienen una segregación de aminoácidos

aumentada en por lo menos un 0,5 % en comparación con la de la cepa de partida no mutagenizada, de acuerdo con la SEQ ID NO: 2.

- 5 11. Polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizado por que comprende por lo menos la secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 283 hasta 381 de la SEQ ID NO: 5.
- 10 12. Procedimiento para la producción de una bacteria corineforme recombinante, caracterizado por que
 (a) un polinucleótido aislado de acuerdo con las reivindicaciones 6 hasta 9 o de acuerdo con las reivindicaciones 10 hasta 11 se transfiere a una bacteria corineforme,
 (b) el gen de malato-quinona oxidoreductasa presente en el cromosoma de la bacteria corineforme, que codifica una secuencia de aminoácidos con L-serina en la posición 111 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, se intercambia por el polinucleótido procedente de a), que codifica una secuencia de aminoácidos, que contiene L-fenilalanina en la posición 111 de la SEQ ID NO: 2 y eventualmente L-serina en la posición 201 de la SEQ ID NO: 2,
 y
 15 (c) se multiplica y reproduce la bacteria corineforme obtenida de acuerdo con las etapas a) y b).
13. Un vector, que contiene el polinucleótido aislado de acuerdo con las reivindicaciones 6 hasta 90 o 10 hasta 11.
- 20 14. Un microorganismo recombinante, que contiene el vector de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizado por que se trata de una bacteria corineforme.
15. Microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 14, caracterizado por que en el caso de la bacteria corineforme se trata del género *Corynebacterium*.
- 25 16. Microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado por que en el caso de la bacteria del género *Corynebacterium* se trata de la especie *Corynebacterium glutamicum*.
- 30 17. Procedimiento para la producción de un L-aminoácido caracterizado por que,
 a) se fermenta una bacteria corineforme aislada en un medio adecuado, conteniendo la bacteria un gen que codifica un polipéptido con una actividad enzimática de malato-quinona oxidoreductasa, siendo reemplazada, en las secuencias de aminoácidos del polipéptido, la L-serina por L-fenilalanina en la posición 111 o en la correspondiente posición, y tratándose en el caso del gen de un polinucleótido de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 hasta 11, y
 35 b) el L-aminoácido se enriquece en el caldo de fermentación o en las células de la bacteria.
18. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, caracterizado por que en el caso de la bacteria corineforme aislada se trata de un mutante de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 6.
- 40 19. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, caracterizado por que se aísla o recoge el L-aminoácido.
20. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, caracterizado por que se purifica el L-aminoácido.
- 45 21. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, caracterizado por que 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 %).
- 50 22. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, caracterizado por que
 a) a partir del caldo de fermentación obtenido a partir de la etapa b) de la reivindicación 17 se elimina la biomasa formada en una proporción de 0 a 100 %, y
 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.
- 55 23. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22, caracterizado por que al caldo de fermentación, 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.
24. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22, caracterizado por que a partir del caldo obtenido antes o después de la etapa a), se elimina agua.
- 60 25. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22, caracterizado por que el producto conformado obtenido en o durante la etapa b) es rociado con un aceite.

Figura 1: Mapa del plásmido pK18mobsacB_mqoS111F

