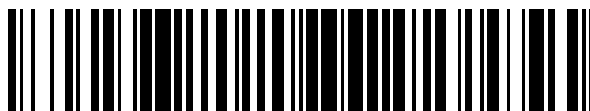


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 518 995**

51 Int. Cl.:

C12N 15/60 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

C12P 13/22 (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2007 E 07821449 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 2078085**

54 Título: **Alelos del gen prpD1 procedente de bacterias corineformes**

30 Prioridad:

26.10.2006 DE 102006050489

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

06.11.2014

73 Titular/es:

EVONIK DEGUSSA GMBH (100.0%)

Rellinghauser Strasse 1-11

45128 Essen, DE

72 Inventor/es:

BATHE, BRIGITTE;

KREUTZER, CAROLINE y

THIERBACH, GEORG

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 518 995 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 prpD1 procedente de bacterias corineformes

- 5 Son objeto del invento unos mutantes y alelos del gen prpD1 procedente de bacterias corineformes, que codifican unas variantes de la 2-metilcitrato deshidratasa (EC: 4.2.1.79) y unos procedimientos para la producción de L-lisina mediando utilización de unas bacterias que contienen estos alelos.

Estado de la técnica

- 10 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.

- 25 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).

- 30 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.

- 35 El cromosoma de *Corynebacterium glutamicum* fue secuenciado completamente hace algún tiempo (Kalinowski y colaboradores, *Journal of Biotechnology* 104, 5-25 (2003)). El cromosoma de *Corynebacterium efficiens* asimismo ya ha sido secuenciado (Nishio y colaboradores, *Genome Res.* 13 (7), 1572-1579 (2003)).

- 40 Unos correspondientes datos de secuencias se pueden tomar de los bancos de datos públicos. Unos apropiados bancos de datos son, por ejemplo, el Banco de Datos de los European Molecular Biologies Laboratories (Laboratorios europeos de biología molecular) (EMBL, Heidelberg, Alemania o respectivamente Cambridge, Reino Unido), el Banco de Datos del National Center for Biotechnology Information (Centro nacional para información sobre biotecnología) (NCBI, Bethesda, MD, EE.UU.), el del Swiss Institute of Bioinformatics (Instituto suizo de bioinformática) (Swissprot, Ginebra, Suiza), de la Protein Information Resource Database (Base de datos de medios de información sobre proteínas) (PIR, Washington, DC, EE.UU.) y el DNA Data Bank of Japan (Banco de datos de ADN del Japón) (DDBJ, 1111 Yata, Mishima, 411-8540, Japón).

- 45 Unas exposiciones recopilativas acerca de la genética, del metabolismo y de la importancia técnica de *Corynebacterium glutamicum* se encuentran en los artículos de Ikeda, de Pfefferle y colaboradores y de Mueller y Huebner en la obra "Microbial Production of L-Amino Acids" (Producción microbiana de L-aminoácidos) (*Advances in Biochemical Engineering* 79, (2003), editorial Springer Verlag, Berlin, Alemania, compilador de edición: T. Scheper), en la edición especial con el título "A New Era in *Corynebacterium glutamicum* Biotechnology" (Una nueva era en la biotecnología de *Corynebacterium glutamicum*) (*Journal of Biotechnology* tomo 104 (1-3), (2003), del *Journal of Biotechnology* (coordinadores de edición: A. Pühler y T. Tauch) y en la obra "Handbook of *Corynebacterium glutamicum*" (Manual de *Corynebacterium glutamicum*) (coordinadores de edición: L. Eggeling y M. Bott, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, EE.UU. 2005).

- 55 La secuencia de nucleótidos del gen prpD1 que codifica la 2-metilcitrato deshidratasa procedente de *Corynebacterium glutamicum* está disponible entre otros lugares en el Banco de Datos del National Center for Biotechnology Information (Centro nacional para información sobre biotecnología) (NCBI) de la National Library of Medicine (Biblioteca nacional de medicina) (Bethesda, MD, EE.UU.) bajo el número de acceso AF434798. Ella puede ser deducida además de la solicitud de patente europea EP 1 108 790 como la secuencia n° 770.

- 60 Claes y colaboradores (*Journal of Bacteriology* 184(10), 2728-2739 (2002)) informan acerca de unas investigaciones genéticas, microbiológicas y bioquímicas en los genes prpD1, prpB1 y prpC1 de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032.

65

Para conseguir una mejor claridad, la secuencia de nucleótidos del gen prpD1 ("gen de tipo silvestre"), que codifica la 2-metilcitrato deshidratasa procedente 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) está representada en la SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de la 2-metilcitrato deshidratasa codificada que se establece a partir de aquella está representada en las SEQ ID NO: 2 y 4. En la SEQ ID NO: 3 se indican adicionalmente las secuencias de nucleótidos que están situadas corriente arriba (en inglés "upstream") y corriente abajo (en inglés "downstream").

Misión del invento

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

Descripción del invento

Un objeto del invento son unos mutantes producidos o respectivamente aislados de bacterias corineformes, que segregan de manera preferida unos aminoácidos, y que contienen un gen o respectivamente un alelo, que codifica un polipéptido con una actividad de 2-metilcitrato deshidratasa, caracterizado por que el polipéptido contiene L-leucina en la posición correspondiente a la posición 272 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o por que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, estando contenida L-leucina en la posición 272.

En el caso de las bacterias corineformes, se prefiere el género *Corynebacterium*. En el caso del género *Corynebacterium* se prefieren las siguientes especies:

Corynebacterium efficiens (la cepa del tipo DSM44549),

Corynebacterium glutamicum (la cepa del tipo ATCC13032)

Corynebacterium thermoaminogenes (por ejemplo, la cepa FERM BP-1539), y

Corynebacterium ammoniagenes (la cepa del tipo 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 ATCC127270,

Corynebacterium lilium DSM20137,

Corynebacterium melassecola ATCC17965

Brevibacterium flavum ATCC14067

Brevibacterium lactofermentum ATCC127269,

Brevibacterium divaricatum ATCC14020, y

Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354.

El concepto de "*Micrococcus glutamicus*" para *Corynebacterium glutamicum* era asimismo usual.

Las cepas de bacterias corineformes empleadas para las medidas técnicas del invento ya poseen de manera preferida la capacidad de enriquecer el aminoácido deseado en la célula y/o de segregarlo al medio nutritivo circundante y acumularlo allí. Para esto, en lo sucesivo se utiliza la expresión de "producir". En particular las cepas de bacterias corineformes que se emplean poseen la capacidad de enriquecer o respectivamente de acumular $\geq$ (por lo menos) 0,25 g/l, $\geq$ 0,5 g/l, $\geq$ 1,0 g/l, $\geq$ 1,5 g/l, $\geq$ 2,0 g/l, $\geq$ 4 g/l o $\geq$ 10 g/l del aminoácido deseado en $\leq$ (como máximo) 120 horas, $\leq$ 96 horas, $\leq$ 48 horas, $\leq$ 36 horas, $\leq$ 24 horas o $\leq$ 12 horas en la célula o en el medio nutritivo. En este caso se puede tratar de unas cepas, que se habían producido mediante una mutagénesis y una selección, mediante unas técnicas de ADN recombinante o mediante una combinación de ambos métodos.

Unos conocidos representantes de cepas de bacterias corineformes que producen o respectivamente segregan L-lisina son por ejemplo:

- 5 Corynebacterium glutamicum DM58-1/pDM6 (= DSM4697)
que ha sido descrito en el documento EP 0 358 940,
- 10 Corynebacterium glutamicum MH20-22B (= DSM16835)
que ha sido descrito en la cita de Menkel y colaboradores (Applied and Environmental Microbiology 55 (3),
684-688 (1989)),
- 15 Corynebacterium glutamicum AHP-3 (= Ferm BP-7382)
que ha sido descrito en el documento EP 1 108 790,
- Corynebacterium glutamicum NRRL B-11474
que ha sido descrito en el documento de patente de los EE.UU. US 4.275.157, y
- Corynebacterium thermoaminogenes AJ12521 (= FERM BP3304)
que ha sido descrito en el documento US 5.250.423.

20 Unos conocidos representantes de cepas de bacterias corineformes que producen o respectivamente segregan L-triptófano son por ejemplo:

- 25 Corynebacterium glutamicum K76 (= Ferm BP-1847)
que ha sido descrito en el documento US 5.563.052,
- Corynebacterium glutamicum BPS13 (= Ferm BP-1777)
que ha sido descrito en el documento US 5.605.818, y
- 30 Corynebacterium glutamicum Ferm BP-3055
que ha sido descrito en el documento US 5.235.940

Unos conocidos representantes de cepas de bacterias corineformes que producen o respectivamente segregan L-valina son por ejemplo:

- 35 Brevibacterium lactofermentum FERM BP-1763
que ha sido descrito en el documento US 5.188.948,
- 40 Brevibacterium lactofermentum FERM BP-3007
que ha sido descrito en el documento US 5.521.074,
- Corynebacterium glutamicum FERM BP-3006
que ha sido descrito en el documento US 5.521.074, y
- 45 Corynebacterium glutamicum FERM BP-1764
que ha sido descrito en el documento US 5.188.948.

Unos conocidos representantes de cepas de bacterias corineformes que producen o respectivamente segregan L-isoleucina son por ejemplo:

- 50 Brevibacterium flavum FERM BP-760
que ha sido descrito en el documento US 4.656.135,
- 55 Brevibacterium flavum FERM BP-2215
que ha sido descrito en el documento US 5.294.547, y
- Corynebacterium glutamicum FERM BP-758
que ha sido descrito en el documento US 4.656.135.

60 Unos conocidos representantes de cepas de bacterias corineformes que producen o respectivamente segregan L-homoserina son por ejemplo:

- Micrococcus glutamicus ATCC 14296
que ha sido descrito en el documento US 3.189.526 y
- 65 Micrococcus glutamicus ATCC 14297
que ha sido descrito en el documento US 3.189.526.

Se encuentran datos acerca de la clasificación taxonómica de unas cepas de este conjunto de bacterias, entre otros lugares, en las citas de Seiler (*Journal of General Microbiology* 129, 1433-1477 (1983), Kinoshita (1985, *Glutamic Acid Bacteria*, p. 115-142. En: Demain y Solomon (coordinadores de edición), *Biology of Industrial Microorganisms* (Biología de los microorganismos industriales). The Benjamin/Cummings Publishing Co., London, Reino Unido), 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.

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 "NRRL" se pueden adquirir de la Agricultural Research Service Patent Culture Collection (Colección de cultivos y patentes del servicio de investigación agrícola) (ARS, Peoria, Illinois, EE.UU.). 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 avanzadas) (AIST Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba Ibaraki, Japón).

Al polipéptido codificado por el gen *prpD1* con una actividad de 2-metilcitrato deshidratasa (*PrpD1*) se le ha asignado correspondientemente a la nomenclatura de la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry = Unión internacional de química pura y aplicada) el número EC 4.2.1.79.

Desde un punto de vista químico, un gen es un polinucleótido. Otro concepto para esto es el de un ácido nucleico.

Por el concepto de aminoácidos proteinógenos se entienden los aminoácidos, que se presentan en proteínas naturales, es decir en proteínas de microorganismos, plantas, animales y seres humanos. Dentro del contexto del presente invento por el concepto de "aminoácidos proteinógenos" se entiende el conjunto de los L-aminoácidos, que se compone de L-ácido aspártico, L-asparagina, L-treonina, L-serina, L-ácido glutámico, L-glutamina, glicina, L-alanina, L-cisteína, L-valina, L-metionina, L-isoleucina, L-leucina, L-tirosina, L-fenilalanina, L-histidina, L-lisina, L-triptófano, L-prolina y L-arginina. A los L-aminoácidos pertenece asimismo la L-homoserina.

Los mutantes conformes al invento segregan de manera preferida los mencionados aminoácidos proteinógenos, en particular L-lisina, L-triptófano, L-valina, L-isoleucina o L-homoserina. 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.

Un objeto del invento son por lo demás unos mutantes de bacterias corineformes, que contienen un alelo de *prpD1*, que codifica un polipéptido con una actividad enzimática de 2-metilcitrato deshidratasa, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, estando contenida L-leucina en la posición 272.

Un objeto del invento son por lo demás unos mutantes de bacterias corineformes, que contienen un alelo de *prpD1*, que codifica un polipéptido con una actividad enzimática de 2-metilcitrato deshidratasa, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, que contiene L-leucina en la posición correspondiente a la posición 272 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, comprendiendo el gen una secuencia de nucleótidos, que es idéntica a la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido, que es obtenible mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante utilización de un par de cebadores, cuyas secuencias de nucleótidos comprenden en cada caso por lo menos 15 nucleótidos consecutivos, que se escogen entre la secuencia de nucleótidos situada entre las posiciones 1 y 750 de la SEQ ID NO: 3 o de la SEQ ID NO: 7 y que se escogen entre la secuencia de nucleótidos complementaria situada entre las posiciones 2.245 y 3.000 de la SEQ ID NO: 3 o de la SEQ ID NO: 7. Un ejemplo de un tal adecuado par de cebadores se representa en las SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10. Como material de partida (el ADN de molde) se prefiere un ADN cromosómico de bacterias corineformes, que en particular han sido tratadas con un mutágeno. Se prefiere especialmente el ADN cromosómico del género *Corynebacterium* y se prefiere muy especialmente el de la especie *Corynebacterium glutamicum*.

Un objeto del invento son por lo demás unos mutantes de bacterias corineformes, que contienen un alelo de *prpD1*, que codifica un polipéptido con una actividad enzimática de 2-metilcitrato deshidratasa, que comprende una secuencia de aminoácidos con una longitud correspondiente a 498 L-aminoácidos, estando contenida L-leucina en la posición 272.

Un objeto del invento son por lo demás unos mutantes de bacterias corineformes, que contienen un alelo de *prpD1*, que codifica un polipéptido con una actividad enzimática de 2-metilcitrato deshidratasa, que en las posiciones 252 hasta 291 de la secuencia de aminoácidos contiene la secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 252 hasta 291 de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8. De manera preferida, la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado contiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 202 hasta 341 de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8, o a las posiciones 152 hasta 391 de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8, o a las posiciones 102 hasta 441 de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8, o a las posiciones 52 hasta 491 de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8, o a las posiciones 2 hasta 495 de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8, o a las

posiciones 2 hasta 496 de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8, o a las posiciones 2 hasta 497 de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8. De manera muy especialmente preferida, la longitud del polipéptido codificado comprende 498 aminoácidos.

Un objeto del invento son por lo demás unos mutantes de bacterias corineformes, que contienen un alelo de prpD1, que codifica un polipéptido con una actividad enzimática de 2-metilcitrato deshidratasa, que contiene L-leucina en la posición 272 o respectivamente en la correspondiente posición de la secuencia de aminoácidos y cuya secuencia de aminoácidos es idéntica además de ello en por lo menos un 90 %, de manera preferida en por lo menos un 92 % o en por lo menos un 94 % o en por lo menos un 96 %, y de manera muy especialmente preferida en por lo menos un 97 % o en por lo menos un 98 % o en por lo menos un 99 % a la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 6 o respectivamente SEQ ID NO: 8.

Un objeto del invento son por lo demás unos mutantes de bacterias corineformes, que contienen un alelo de prpD1, que codifica un polipéptido con una actividad enzimática de 2-metilcitrato deshidratasa, que contiene L-leucina en la posición 272 o respectivamente en la correspondiente posición de la secuencia de aminoácidos, y cuya secuencia de nucleótidos es idéntica además en por lo menos un 90 %, de manera preferida en por lo menos un 92 %, o en por lo menos un 94 %, o en por lo menos un 96 %, y de manera muy especialmente preferida en por lo menos un 97 %, o en por lo menos un 98 %, o en por lo menos un 99 %, a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5.

Es conocido que unos intercambios conservativos de aminoácidos modifican sólo de manera insignificante a la actividad enzimática. De modo correspondiente, el alelo prpD1 contenido en los mutantes conformes al invento, que codifica un polipéptido con una actividad enzimática de 2-metilcitrato deshidratasa, adicionalmente a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 6 o respectivamente en la SEQ ID NO: 8, puede contener uno (1) o varios intercambio(s) conservativo(s) de aminoácidos. De manera preferida, el polipéptido contiene a lo sumo dos (2), a lo sumo tres (3), a lo sumo cuatro (4), o a lo sumo cinco (5) intercambios conservativos de aminoácidos. Por tales intercambios conservativos de aminoácidos la actividad enzimática no es afectada esencialmente.

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 aminoácidos que contienen grupos hidroxilo se habla de intercambios conservativos cuando se intercambian una por otra serina y treonina.

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 2-metilcitrato deshidratasa de diferentes bacterias tales como, por ejemplo, Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis, Corynebacterium efficiens y Corynebacterium glutamicum está contenido un motivo de secuencia que se compone de la sucesión Arg-Glu-Leu-Asp-Phe-His-Asp-Thr-Phe-Leu-Ala-Ala-Asp/Glu-Tyr-Ser-His-Pro, un motivo de secuencia que se compone de la sucesión Gly-Ile-Cys-Leu-His-Glu-His-Lys-Ile-Asp-His-Val-Ala-His-Leu-Gly-Pro, y también un motivo de secuencia que se compone de la sucesión Pro-Ala-Pro-Ile-Trp-Glu-Gly-Glu-Asp-Gly-Val-Ile-Ala-Trp-Leu-Leu. La designación "Asp/Glu" significa que en la posición correspondiente puede presentarse "Asp o Glu".

De una manera correspondiente, se prefieren aquellos mutantes de bacterias corineformes, que contienen un alelo de prpD1, que codifica un polipéptido con una actividad enzimática de 2-metilcitrato deshidratasa, que comprende por lo menos una secuencia de aminoácidos escogida entre el conjunto que se compone de Arg-Glu-Leu-Asp-Phe-His-Asp-Thr-Phe-Leu-Ala-Ala-Asp/Glu-Tyr-Ser-His-Pro, Gly-Ile-Cys-Leu-His-Glu-His-Lys-Ile-Asp-His-Val-Ala-His-Leu-Gly-Pro y Pro-Ala-Pro-Ile-Trp-Glu-Gly-Glu-Asp-Gly-Val-Ile-Ala-Trp-Leu-Leu, y que contiene uno de los aminoácidos proteinógenos en la posición 272 o respectivamente en la posición correspondiente o comparable de la secuencia de aminoácidos contiene uno de los aminoácidos proteinógenos estando exceptuada la L-prolina, de manera preferida L-leucina.

El motivo de secuencia de aminoácidos Arg-Glu-Leu-Asp-Phe-His-Asp-Thr-Phe-Leu-Ala-Ala-Asp/Glu-Tyr-Ser-His-Pro está contenido, por ejemplo, en la SEQ ID NO: 2 o respectivamente 4 o 6 o respectivamente 8 desde la posición 102 hasta la 118. El motivo de secuencia de aminoácidos Gly-Ile-Cys-Leu-His-Glu-His-Lys-Ile-Asp-His-Val-Ala-His-Leu-Gly-Pro está contenido, por ejemplo, en la SEQ ID NO: 2 o respectivamente 4 o 6 o respectivamente 8 desde la posición 156 hasta la 172. El motivo de secuencia de aminoácidos Pro-Ala-Pro-Ile-Trp-Glu-Gly-Glu-Asp-Gly-Val-Ile-Ala-Trp-Leu-Leu está contenido, por ejemplo, en la SEQ ID NO: 2 o respectivamente 4 o 6 o respectivamente 8 desde la posición 240 hasta la 255.

Un objeto del invento son finalmente unos mutantes de bacterias corineformes, que contienen un alelo de prpD1, que codifica un polipéptido con una actividad enzimática de 2-metilcitrato deshidratasa, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente de la SEQ ID NO: 8.

- 5 Un objeto del invento son finalmente también unos mutantes de bacterias corineformes, que contienen un alelo de prpD1 correspondiente a la SEQ ID NO: 5 o respectivamente a la SEQ ID NO: 7.

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

- 10 Por el concepto de "una posición correspondiente a la posición 272 de la secuencia de aminoácidos" o de "una posición comparable a la posición 272 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 272 de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8) 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 formalmente en una unidad en el caso de una supresión. Por ejemplo, mediante una supresión del codón GAG que codifica el aminoácido L-ácido glutámico, en la posición 19 de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8 la L-leucina se desplaza desde la posición 272 hasta la posición 271. El dato sobre la longitud sería entonces: 497 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 272) 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 formalmente 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 o del programa MAFFT.

- 25 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 diferencia 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 % con respecto de la actividad del polipéptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8.

Un método para la determinación de la actividad enzimática de la 2-metilcitrato deshidratasa se describe en la cita de Horswill y Escalante-Semerena (Biochemistry 40(15), 4703-4713 (2001)).

- 35 Un objeto del invento son de modo correspondiente también unos alelos de prpD1, que codifican unas variantes de polipéptidos de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8, que contienen una o varias inserción/ones o supresión/ones. De manera preferida, el polipéptido contiene como máximo 5, como máximo 4, como máximo 3 o como máximo 2 inserciones o supresiones de aminoácidos.

- 40 Los motivos de secuencias Arg-Glu-Leu-Asp-Phe-His-Asp-Thr-Phe-Leu-Ala-Ala-Asp/Glu-Tyr-Ser-His-Pro, Gly-Ile-Cys-Leu-His-Glu-His-Lys-Ile-Asp-His-Val-Ala-His-Leu-Gly-Pro y Pro-Ala-Pro-Ile-Trp-Glu-Gly-Glu-Asp-Gly-Val-Ile-Ala-Trp-Leu-Leu no son desgarrados de manera preferida por tales inserciones/supresiones.

- 45 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 unas sustancias mutágenas tales como, por ejemplo, la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), el etilmetanosulfonato (EMS), el 5-bromouracilo, o de la 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 la 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.

- 60 A partir de la población celular mutagenizada se sacan y multiplican mutantes o respectivamente células. De manera preferida, en otra etapa se investiga su capacidad para segregar unos aminoácidos, de manera preferida L-lisina, L-triptófano, L-valina, L-isoleucina o L-homoserina, en un cultivo por tandas (en inglés "batch") mediando utilización de un medio nutritivo adecuado. Unos/as adecuados/as medios nutritivos y condiciones de ensayo se describen, 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. En los casos de las utilizaciones de unas instalaciones robóticas apropiadas, tales como las que se describen por ejemplo en las citas de Zimmermann y colaboradores (VDI Berichte n° 1.841, editorial VDI, Düsseldorf, Alemania 2004, 439-443) o de Zimmermann (Chemie Ingenieur Technik 77 (4), 426-428 (2005)), se pueden investigar numerosos mutantes en un breve período de tiempo. Por lo general se investigan como máximo 3.000, como máximo 10.000, como máximo 30.000 o también como máximo 60.000 mutantes y eventualmente incluso

más, De esta manera se identifican unos mutantes, 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, aquellos mutantes, cuya secreción de aminoácidos se ha aumentado en por lo menos un 0,5 %.

A continuación, a partir de los mutantes se pone a disposición o respectivamente se aísla un ADN, y con ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa, mediando utilización de unos pares de cebadores, que permiten la amplificación del gen *prpD1* o respectivamente del alelo de *prpD1* conforme al invento, o de la mutación conforme al invento en la posición 272, se sintetiza el correspondiente polinucleótido. De manera preferida, el ADN se aísla a partir de aquellos mutantes, que segregan aminoácidos en una forma aumentada.

A este fin, se pueden escoger unos pares de cebadores arbitrarios a partir de la secuencia de nucleótidos situada corriente arriba y corriente abajo de la mutación conforme al invento, y de la secuencia de nucleótidos que es complementaria con respecto a aquella. Un primer cebador de un par de cebadores comprende en este caso de manera preferida por lo menos 15, por lo menos 18, por lo menos 20, por lo menos 21 o por lo menos 24 nucleótidos consecutivos, escogidos entre la secuencia de nucleótidos situada entre las posiciones 1 y 1.563 de la SEQ ID NO: 3 o de la SEQ ID NO: 7. 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 de nucleótidos complementaria entre las posiciones 3.000 y 1.567 de la SEQ ID NO: 3 o de la SEQ ID NO: 7. Si se desea la amplificación de la región codificadora, entonces el par de cebadores se escoge a partir de la secuencia de nucleótidos situada entre las posiciones 1 y 750 de la SEQ ID NO: 3 o de la SEQ ID NO: 7 y a partir de la secuencia de nucleótidos complementaria entre las posiciones 3.000 y 2.245 de la SEQ ID NO: 3 o de la SEQ ID NO: 7. Un adecuado par de cebadores es por ejemplo el par de cebadores a base de *prpD1_XL-A1* y *prpD1-XL-E1* que es reproducido bajo las SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10. Un producto de PCR producido mediando utilización de este par de cebadores está representado en la SEQ ID NO: 13.

Si se desea la amplificación de una parte de la región codificadora, tal como se representa, por ejemplo, en las SEQ ID NO: 17 y 19, entonces el par de cebadores se escoge de manera preferida a partir de la secuencia de nucleótidos que se encuentra situada entre las posiciones 751 y 1.563 de la SEQ ID NO: 3 o de la SEQ ID NO: 7, y a partir de la secuencia de nucleótidos complementaria que está situada entre las posiciones 2.244 y 1.567 de la SEQ ID NO: 3 o de la SEQ ID NO: 7.

El cebador puede ser provisto, además de esto, de unos sitios de reconocimiento para enzimas de restricción, de un grupo de biotina o de otros elementos accesorios, tales como los que se describen dentro del estado de la técnica. La longitud total del cebador es por lo general como máximo de 30, 40, 50 ó 60 nucleótidos.

Para la producción de polinucleótidos mediante amplificación de unas secuencias escogidas, tales como las del alelo de *prpD1* conforme al invento, a partir de un ADN dispuesto previamente, por ejemplo cromosómico (= ADN de molde = en inglés "template DNA"), mediante la 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.

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 por lo demás unos desoxinucleósido-trifosfatos en una concentración de 0,1 - 16,6 mM. Los cebadores se disponen previamente en la tanda de reacción con una concentración final de 0,1 - 3 µM y el ADN de molde, en el caso óptimo, con 10² hasta 10⁵ copias. También se pueden emplear desde 10⁶ hasta 10⁷ copias. La correspondiente polimerasa se añade a la tanda de reacción en una cantidad de 2-5 unidades. Una típica tanda de reacción tiene un volumen de 20 - 100 µl.

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

Una típica evolución de una PCR se compone de tres diferentes escalones de temperatura, que se repiten consecutivamente. De antemano, la reacción es iniciada 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, que es 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 (en inglés "extensión") del cebador dispuesto previamente en el caso del 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 en el de 72°C a 68°C. La duración de esta etapa de prolongación 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 prolongación durante 4 - 10 minutos finaliza la reacción. Los polinucleótidos producidos de esta manera son designados también como materiales amplificados; el concepto de fragmento de ácido nucleico es asimismo habitual.

Un producto de PCR producido mediante utilización del par de cebadores prpD1_XL_A1 / prpD1_XL_E1 (véanse la SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO: 10) está representado en la SEQ ID NO: 13.

Otras instrucciones e informaciones 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 "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).

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, 1067 (1990)), y el polipéptido que ha sido codificado por esta secuencia de nucleótidos se analiza 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 en 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 de Proteomics ExpASy en el world wide web (internet) (Gasteiger y colaboradores, Nucleic Acids Research 31, 3784-3788 (2003)).

De esta manera se identifican unos mutantes, cuyos alelos de prpD1 codifican unos polipéptidos con una actividad enzimática de 2-metilcitrato deshidratasa, que en la posición 272 de la secuencia de aminoácidos, o respectivamente en la posición correspondiente o comparable, contienen uno de los aminoácidos proteinógenos estando exceptuada la L-prolina. Se prefiere el intercambio por L-leucina.

Eventualmente, se determina el cromosoma global de los mutantes. En este caso, se puede emplear el método descrito por Margulies y colaboradores (Nature 437(7057): 376-2720 (2005)) y Velicer y colaboradores (Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 103(21), 8107-8112 (2006)), que es conocido en el mundo especializado bajo la palabra clave "pyrosequencing", y que hace posible una rápida secuenciación de genomas completos.

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

- a) tratamiento de una bacteria corineforme, que posee la capacidad de segregar aminoácidos, con un agente mutágeno,
- b) aislamiento y multiplicación del mutante producido en a)
- c) de manera preferida, determinación de la capacidad del mutante en un medio para segregar por lo menos un 0,5 % más del aminoácido, o para enriquecerlo en el interior de las células, en comparación con la bacteria corineforme empleada en a),
- d) puesta a disposición de un ácido nucleico procedente del mutante obtenido en b),
- e) producción de una molécula de ácido nucleico (o respectivamente de un material amplificado o de un fragmento 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 situada entre las posiciones 1 y 1.563, de manera preferida 1 hasta 750 de la SEQ ID NO: 3 o de la SEQ ID NO: 7, y de un segundo cebador, que comprende por lo menos 15 nucleótidos consecutivos escogidos a partir de la secuencia de nucleótidos complementaria que se encuentra situada entre las posiciones 3.000 y 1.567, de manera preferida 3.000 y 2.245, de la SEQ ID NO: 3 o 7,

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

g) eventualmente, comparación de la secuencia de aminoácidos determinada en f) con la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8, y

h) identificación de un mutante, que contiene un polinucleótido, que codifica un polipéptido, que contiene L-leucina en la posición 272 o en una posición comparable.

Los mutantes producidos de este modo contienen típicamente una (1) copia del alelo de prpD1 descrito.

En la SEQ ID NO: 5 se reproduce a modo de ejemplo la región codificadora del alelo de prpD1 de un mutante conforme al invento. La región codificadora del gen de tipo silvestre se reproduce como la SEQ ID NO: 1. La SEQ ID NO: 1 contiene en la posición 814 la nucleobase citosina, en la posición 815 la nucleobase citosina y en la posición 816 la nucleobase citosina. La SEQ ID NO: 1 contiene por consiguiente desde la posición 814 hasta la 816 el codón CCC que codifica el aminoácido L-prolina. La SEQ ID NO: 5 contiene en la posición 815 la nucleobase timina. Mediante esta transición de citosina a timina resulta en las posiciones 814 hasta 816 el codón CTC que codifica el aminoácido L-leucina.

Además de esto, las secuencias de nucleótidos representadas en la SEQ ID NO: 5 o respectivamente 7 pueden contener otros intercambios de bases, que han resultado por medio del tratamiento de mutagénesis, pero que no se exteriorizan en una secuencia de aminoácidos modificada. Tales mutaciones son designadas en el mundo especializado también como mutaciones mudas o neutras. Estas mutaciones mudas pueden estar contenidas ya asimismo en la bacteria corineforme que se emplea para el tratamiento de mutagénesis.

Las bacterias corineformes utilizadas para la mutagénesis poseen de manera preferida ya 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.

Las bacterias corineformes que producen L-lisina poseen típicamente una aspartato cinasa resistente a la retroalimentación (en inglés "feed back") o respectivamente desensibilizada. Por el concepto de "aspartato cinasas resistentes frente a la retroalimentación" se entienden unas aspartato cinasas (LysC) 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 la lisina a solas o por la AEC a solas. Los genes o respectivamente alelos que codifican estas aspartato cinasas desensibilizadas son designados también como alelos de lysC^{FBR}. Dentro del estado de la técnica se describen numerosos alelos de lysC^{FBR}, que codifican unas variantes de la aspartato cinasa, los cuales poseen unos 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 está representada en la SEQ ID NO: 11 y el polipéptido codificado por este gen está representado en la SEQ ID NO: 12.

Las bacterias corineformes que producen la L-lisina, empleadas para las medidas técnicas del invento, disponen preferiblemente de un alelo de lysC, que codifica una variante de la aspartato cinasa, que posee la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, conteniendo ésta uno o varios intercambios de aminoácidos, escogidos entre el conjunto que se compone de:

LysC A279T (intercambio de L-alanina en la posición 279 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 12 por L-treonina; véanse el documento US 5.688.671 y los números de acceso E06825, E06826, E08178 e I74588 hasta I74597),

LysC A279V (intercambio de L-alanina en la posición 279 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 12 por L-valina; véanse el documento de solicitud de patente japonesa JP 6-261766 y el número de acceso E08179),

LysC L297Q (intercambio de L-leucina en la posición 297 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 12 por L-glutamina; véase el documento de solicitud de patente alemana DE 102006026328),

LysC S301F (intercambio de L-serina en la posición 301 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 12 por L-fenilalanina; véanse el documento US 6.844.176 y el número de acceso E08180),

5 LysC S301Y (intercambio de L-serina en la posición 301 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 12 por L-tirosina, véanse la cita de Kalinowski y colaboradores (Molecular and General Genetics 224, 317-324 (1990)) y el número de acceso X57226),

10 LysC T308I (intercambio de L-treonina en la posición 308 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 12 por L-isoleucina; véanse el documento JP 6-261766 y el número de acceso E08181),

15 LysC T311I (intercambio de L-treonina en la posición 311 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 12 por L-isoleucina; véanse el documento de solicitud de patente internacional WO 00/632728 y el documento US 6.893.848),

20 LysC S317A (intercambio de L-serina en la posición 317 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 12 por L-alanina; véanse el documento US 5.688.671 y el número de acceso I74589),

LysC R320G (intercambio de L-arginina en la posición 320 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 12 por glicina; véanse la cita de Jetten y colaboradores (Applied Microbiology and Biotechnology 43, 76-82 (1995)) y el número de acceso L27125),

25 LysC G345D (intercambio de glicina en la posición 345 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 12 por L-ácido aspártico; véanse la cita de Jetten y colaboradores (Applied Microbiology and Biotechnology 43, 76-82 (1995)) y el número de acceso L16848),

30 LysC T380I (intercambio de L-treonina en la posición 380 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 12 por L-isoleucina, véanse el documento WO 01/49854 y el número de acceso AX192358), y

35 LysC S381F (intercambio de L-serina en la posición 381 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 12 por L-fenilalanina; véase el documento EP 0435132).

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: 12 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: 12 por treonina), S381F (intercambio de serina en la posición 381 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 12 por fenilalanina) y S317A (intercambio de serina en la posición 317 de la proteína aspartato cinasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 12 por alanina)

45 Se prefieren muy 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: 12 por isoleucina).

La cepa DSM 16833 (véase el documento WO 06/063660) posee, al igual que la cepa ATCC 21543 (véase el documento US 3.708.395), un alelo de lysC^{FBR}, que codifica una proteína aspartato cinasa, que contiene un intercambio de aminoácidos T311I.

50 La cepa NRRL B-11474 (véase el documento US 4.275.157) posee un alelo de lysC^{FBR}, que codifica una proteína aspartato cinasa, que contiene los intercambios de aminoácidos A279T y S381F.

Según el modo más arriba descrito, partiendo de la cepa ATCC 21543 se aisló un mutante designado como DM1916, que contiene un alelo de prpD1, el cual codifica un polipéptido, en el que está contenida L-leucina en la posición 272 de la secuencia de aminoácidos. La secuencia de nucleótidos de la región codificadora del alelo de prpD1 del mutante DM1916 se representa como la SEQ ID NO: 5 y la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado se representa como la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8.

60 Además de esto, se pueden utilizar unas bacterias corineformes que segregan L-lisina, las cuales poseen unas propiedades, tales como las que se conocen a partir del estado de la técnica.

Las bacterias corineformes que producen L-triptófano poseen típicamente una antranilato sintasa resistente a la retroalimentación o respectivamente desensibilizada. Por el concepto de "antranilato sintasa resistente a la retroalimentación" se entienden unas antranilato sintasas que, en comparación con la forma silvestre, tienen una sensibilidad más pequeña en por lo menos 5 a 10 %, o en por lo menos 10 % a 15 % o en por lo menos 10 % a

20 % frente a la inhibición por triptófano o 5-fluoro-triptófano (Matsui y colaboradores, Journal of Bacteriology 169 (11): 5330 - 5332(1987)) o por unos 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.

Unas bacterias corineformes que producen L-valina poseen típicamente una acetolactato sintasa (acetohidroxiácido sintasa) [n° de EC 2.2.1.6] resistente a la retroalimentación o respectivamente desensibilizada.

Por el concepto de "una acetolactato sintasa resistente a la retroalimentación" se entiende una acetolactato sintasa que, en comparación con la forma silvestre, tiene una sensibilidad más pequeña frente a la inhibición por uno o varios de los aminoácidos escogidos entre el conjunto formado por L-valina, L-iso-leucina y L-leucina, de manera preferida por L-valina.

La acetolactato sintasa (IlvB, IlvN) de *Corynebacterium glutamicum* se compone de una denominada gran subunidad codificada por el gen *ilvB* y de una denominada pequeña subunidad codificada por el gen *ilvN* (Keilhauer y colaboradores, Journal of Bacteriology 175(17), 5595-5603 (1993). En el documento WO 05/003357 y en la cita de Elisakova y colaboradores (Applied and Environmental Microbiology 71(1):207-13 (2005)) se informa sobre unas variantes de la subunidad de IlvN, que confieren a la acetolactato sintasa una resistencia frente a L-valina, L-iso-leucina y L-leucina. Una variante contiene en la posición 21 de la secuencia de aminoácidos L-ácido aspártico en lugar de L-iso-leucina (IlvN I21D) y en la posición 22 L-fenilalanina en lugar de L-iso-leucina (IlvN I22F). La segunda variante contiene en la posición 20 de la secuencia de aminoácidos L-ácido aspártico en lugar de glicina (IlvN G20D), en la posición 21 de la secuencia de aminoácidos L-ácido aspártico en lugar de L-iso-leucina (IlvN I21D) y en la posición 22 L-fenilalanina en lugar de L-iso-leucina (IlvN I22F).

Unas bacterias corineformes que producen L-iso-leucina poseen típicamente una treonina deshidratasa (= treonina desaminasa) resistente a la retroalimentación o respectivamente desensibilizada.

Por el concepto de "una treonina deshidratasa resistente a la retroalimentación" se entiende una treonina deshidratasa [n° de EC 4.3.1.19] que, en comparación con la forma silvestre, tiene una sensibilidad más pequeña frente a la inhibición por L-iso-leucina. Los genes o respectivamente alelos que codifican esta treonina deshidratasa desensibilizada son designados también como alelos de *ilvA*^{FBR}.

La región codificadora del gen *ilvA* de tipo silvestre de *Corynebacterium glutamicum* correspondiente al n° de acceso L01508 del banco de datos NCBI está representada en la SEQ ID NO: 17 y el polipéptido codificado por este gen está representado en la SEQ ID NO: 18.

Las variantes de la treonina deshidratasa descritas en el documento US 6.107.063 y en la cita de Morbach y colaboradores (Applied and Environmental Microbiology 61 (12), 4315-4320 (1995)) contienen uno o varios de los intercambios de aminoácidos que se escogen entre el conjunto formado por:

IlvA M199V (intercambio de L-metionina en la posición 199 de la proteína treonina deshidratasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 18 por L-valina; véase el documento US 6.107.063),

IlvA A257G (intercambio de L-alanina en la posición 257 de la proteína treonina deshidratasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 18 por L-arginina; véase el documento US 6.107.063),

IlvA H278R (intercambio de L-histidina en la posición 278 de la proteína treonina deshidratasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 18 por L-arginina; véase el documento US 6.107.063),

IlvA V323A (intercambio de L-valina en la posición 323 de la proteína treonina deshidratasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 18 por L-alanina; véase la cita de Morbach y colaboradores),

IlvA L351S (intercambio de L-leucina en la posición 351 de la proteína treonina deshidratasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 18 por L-serina; véase el documento US 6.107.063),

IlvA D378G (intercambio de L-ácido aspártico en la posición 378 de la proteína treonina deshidratasa codificada de acuerdo con la SEQ ID NO: 18 por glicina; véase la cita de Morbach y colaboradores).

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

Es un objeto del invento asimismo un polinucleótido aislado, que codifica un polipéptido con una actividad enzimática de 2-metilcitrato deshidratasa, que contiene L-leucina en la posición correspondiente a la posición 272 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, estando contenida L-leucina en la posición 272.

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

Por lo demás, para la mutagénesis del gen *prpD1* se pueden emplear unos métodos in vitro. En el caso de la utilización de unos métodos in vitro, unos polinucleótidos aislados, que contienen un gen *prpD1* de una bacteria corineforme, de manera preferida el gen de tipo silvestre de *Corynebacterium glutamicum* que ha sido descrito en el estado de la técnica, son sometidos a un tratamiento mutágeno.

En el caso de los polinucleótidos aislados se puede tratar por ejemplo del ADN total aislado o respectivamente del ADN cromosómico aislado o también de unos materiales amplificados del gen *prpD1*, que se habían producido con ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Tales materiales amplificados son designados también como unos productos de la PCR. Unas instrucciones para realizar la amplificación de unas 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 *prpD1* 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 objeto del invento es por lo demás un polinucleótido aislado, que codifica un polipéptido con una actividad enzimática de 2-metilcitrato deshidratasa, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, estando contenida L-leucina en la posición 272 de la secuencia de aminoácidos.

Un objeto del invento es por lo demás un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido con una actividad enzimática de 2-metilcitrato deshidratasa, que comprende una secuencia de aminoácidos con una longitud de 498 aminoácidos, y conteniendo el polipéptido L-leucina en la posición correspondiente a la posición 272 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o comprendiendo el polipéptido la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, en la que está contenida L-leucina en la posición 272.

Un objeto del invento es por lo demás un polinucleótido aislado, que codifica un polipéptido con una actividad enzimática de 2-metilcitrato deshidratasa, que en las posiciones 252 hasta 291 de la secuencia de aminoácidos contiene la secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 252 hasta 291 de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8. De manera preferida, la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado contiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 202 hasta 341 de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8 o a las posiciones 152 hasta 391 de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8 o a las posiciones 102 hasta 441 de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8 o a las posiciones 52 hasta 491 de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8 o a las posiciones 2 hasta 495 de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8 o a las posiciones 2 hasta 496 de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8 o a las posiciones 2 hasta 497 de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8. De manera muy especialmente preferida, la longitud del polipéptido codificado comprende 498 aminoácidos.

Un objeto del invento es por lo demás un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido con una actividad enzimática de 2-metilcitrato deshidratasa, que contiene L-leucina en la posición correspondiente a la posición 272 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, estando contenida L-leucina en la posición 272, y que comprende una secuencia de nucleótidos, que es idéntica a la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido, que es obtenible mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediando utilización del par de cebadores, cuyas secuencias de nucleótidos comprenden en cada caso por lo menos 15 nucleótidos consecutivos, que se escogen entre la secuencia de nucleótidos situada entre las posiciones 1 y 750 de la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 7, y entre la secuencia de nucleótidos complementaria entre las posiciones 3.000 y 2.245 de la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 7. Un ejemplo de un tal par de cebadores está

representado en la SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO: 10. Como material de partida (= el ADN de molde) se prefiere el ADN cromosómico de unas bacterias corineformes, que han sido tratadas en particular con un mutágeno. Se prefiere especialmente el ADN cromosómico del género *Corynebacterium* y de manera muy especialmente preferida el de la especie *Corynebacterium glutamicum*.

Un objeto del invento es por lo demás un polinucleótido aislado que se hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos complementaria a la SEQ ID NO: 5, y que codifica un polipéptido con una actividad enzimática de 2-metilcitrato deshidratasa, que contiene L-leucina en la posición correspondiente a la posición 272 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, estando contenida L-leucina en la posición 272.

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

Para la reacción de hibridación se puede emplear por ejemplo un tampón correspondiente a un tampón 5x SSC a una temperatura de aproximadamente 50°C - 68°C. En este caso, las sondas se pueden hibridar también con unos polinucleótidos, que tienen menos que un 90 % de identidad con la secuencia de nucleótidos de la sonda empleada. Tales híbridos son menos estables y son eliminados mediante un lavado en condiciones rigurosas. Esto se puede realizar por ejemplo mediante una disminución de la concentración de sales a 2x SSC y eventualmente a continuación a 0,5x SSC (The DIG System Users Guide for Filter Hybridization, de la entidad Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania 1995), ajustándose una temperatura de aproximadamente 50°C - 68°C, de aproximadamente 52°C - 68°C, de aproximadamente 54°C - 68°C, de aproximadamente 56°C - 68°C, de aproximadamente 58°C - 68°C, de aproximadamente 60°C - 68°C, de aproximadamente 62°C - 68°C, de aproximadamente 64°C - 68°C o de aproximadamente 66°C - 68°C.

Se prefieren unos intervalos de temperaturas de aproximadamente 64°C - 68°C o de aproximadamente 66°C - 68°C. Es posible eventualmente disminuir la concentración de sales hasta una concentración correspondiente a 0,2x SSC o 0,1x SSC. Eventualmente, el tampón SSC contiene dodecilsulfato de sodio (SDS) en una concentración de 0,1 %. Mediante un aumento escalonado de la temperatura de hibridación en unos escalones de aproximadamente 1 - 2°C desde 50°C hasta 68°C se pueden aislar unos fragmentos de polinucleótidos, que poseen por lo menos un 90 % o por lo menos un 91 %, de manera preferida por lo menos un 92 % o por lo menos un 93 % o por lo menos un 94 % o por lo menos un 95 % o por lo menos un 96 %, y de manera muy especialmente preferida por lo menos un 97 % o por lo menos un 98 % o por lo menos un 99 % de identidad con la secuencia o respectivamente con la secuencia complementaria de la sonda empleada, y que codifican un polipéptido con una actividad enzimática de 2-metilcitrato deshidratasa, que contiene el intercambio de aminoácidos conforme al invento. La secuencia de nucleótidos del polinucleótido obtenido de esta manera se determina con unos métodos conocidos. Otras instrucciones para la hibridación son obtenibles en el mercado en la forma de unos denominados estuches (p.ej. DIG Easy Hyb de la entidad Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, n° de catálogo 1603558). Las secuencias de nucleótidos obtenidas de esta manera codifican unos polipéptidos con una actividad enzimática de 2-metilcitrato deshidratasa, que son idénticos en por lo menos un 90 %, de manera preferida en por lo menos un 92 % o en por lo menos un 94 % o en por lo menos un 96 %, y de manera muy especialmente preferida en por lo menos un 97 % o en por lo menos un 98 % o en por lo menos un 99 % a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente de la SEQ ID NO: 8, y que contiene el intercambio de aminoácidos conforme al invento.

Un objeto del invento es por lo demás un polinucleótido aislado, que codifica un polipéptido con una actividad enzimática de 2-metilcitrato deshidratasa, que contiene L-leucina en la posición correspondiente a la posición 272 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2

o que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, estando contenida L-leucina en la posición 272, y que comprende una secuencia de aminoácidos, que además de ello es idéntica en por lo menos un 90 %, de manera preferida en por lo menos un 92 % o en por lo menos un 94 % o en por lo menos un 96 %, y de manera muy especialmente preferida en por lo menos un 97 % o en por lo menos un 98 % o en por lo menos un 99 % a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente de la SEQ ID NO: 8.

Un objeto del invento es por lo demás un polinucleótido aislado, que codifica un polipéptido con una actividad enzimática de 2-metilcitrato deshidratasa, que contiene L-leucina en la posición correspondiente a la posición 272 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2

o que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, estando contenida L-leucina en la posición 272, y que comprende una secuencia de nucleótidos, que además de ello es idéntica en por lo menos un 90 %, de manera preferida en por lo menos un 92 % o en por lo menos un 94 % o en por lo menos un 96 %, y de manera muy especialmente preferida en por lo menos un 97 % o en por lo menos un 98 % o en por lo menos un 99 % a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5.

Además de esto, se prefieren aquellos polinucleótidos aislados, que codifican un polipéptido con una actividad enzimática de 2-metilcitrato deshidratasa, que contiene L-leucina en la posición correspondiente a la posición 272 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2

o que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, estando contenida L-leucina en la posición 272, y que por lo menos contiene un motivo de secuencia o respectivamente una secuencia de aminoácidos escogida entre el conjunto formado por Arg-Glu-Leu-Asp-Phe-His-Asp-Thr-Phe-Leu-Ala-Ala-Asp/Glu-Tyr-Ser-His-Pro, Gly-Ile-Cys-Leu-His-Glu-His-Lys-Ile-Asp-His-Val-Ala-His-Leu-Gly-Pro y Pro-Ala-Pro-Ile-Trp-Glu-Gly-Glu-Asp-Gly-Val-Ile-Ala-Trp-Leu-Leu.

Las designaciones "Asp/Glu" significan que en la correspondiente posición puede presentarse "Asp o Glu".

Un objeto del invento es por lo demás un polinucleótido aislado, que codifica un polipéptido con una actividad enzimática de 2-metilcitrato deshidratasa, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8. Eventualmente, el polipéptido codificado contiene uno (1) o varios intercambio(s) conservativo(s) de aminoácido(s). De manera preferida, el polipéptido contiene a lo sumo dos (2), a lo sumo tres (3), a lo sumo cuatro (4) o a lo sumo cinco (5) intercambios conservativos de aminoácidos.

Un objeto del invento es por lo demás un polinucleótido aislado, que codifica un polipéptido con una actividad enzimática de 2-metilcitrato deshidratasa, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8, inclusive una prolongación junto al extremo terminal de N o de 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 radicales de aminoácidos.

Un objeto del invento son finalmente también unos alelos de prpD1, que codifican unas variantes de polipéptidos de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8, que contienen una o varias inserciones o supresiones. De manera preferida, éstas contienen como máximo 5, como máximo 4, como máximo 3 o como máximo 2 inserciones o supresiones de aminoácidos. El/los motivo(s) de secuencia Arg-Glu-Leu-Asp-Phe-His-Asp-Thr-Phe-Leu-Ala-Ala-Asp/Glu-Tyr-Ser-His-Pro y/o Gly-Ile-Cys-Leu-His-Glu-His-Lys-Ile-Asp-His-Val-Ala-His-Leu-Gly-Pro y/o Pro-Ala-Pro-Ile-Trp-Glu-Gly-Glu-Asp-Gly-Val-Ile-Ala-Trp-Leu-Leu no es/son desgarrado(s) por tales inserciones/supresiones.

Un objeto del invento es por lo demás un polinucleótido aislado, que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 5 o 7.

Un objeto del invento es finalmente un polinucleótido aislado que contiene el alelo de prpD1 del mutante DM1916.

Un objeto del invento es además de ello un polinucleótido aislado, que comprende una parte de la región codificadora de un alelo de prpD1 conforme al invento, comprendiendo el polinucleótido aislado en cualquier caso la parte de la región codificadora que contiene el intercambio de aminoácidos en la posición 272 de la secuencia del polipéptido codificado.

En particular, está comprendida/o una molécula de ácido nucleico o respectivamente un fragmento de ADN, que codifica por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 252 hasta 291 de la SEQ ID NO: 2, o que codifica por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 202 hasta 341 de la SEQ ID NO: 2, o que codifica por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 152 hasta 391 de la SEQ ID NO: 2, o que codifica por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 102 hasta 441 de la SEQ ID NO: 2, o que codifica por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 52 hasta 491 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, o que codifica por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 2 hasta 496 de la SEQ ID NO: 2, o que codifica por lo menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 2 hasta 497 de la SEQ ID NO: 2, estando contenida L-leucina en la posición correspondiente a la posición 272 de la SEQ ID NO: 2.

Un ejemplo de un marco de lectura que comprende un polinucleótido, que codifica por lo menos la secuencia de aminoácidos de la posición 252 hasta la 291 correspondiente a la SEQ ID NO: 2, estando contenido en la posición correspondiente a la posición 272 de la secuencia de aminoácidos uno de los aminoácidos proteinógenos (Xaa) estando exceptuada L-prolina, se expone seguidamente:

```
gcg tgg ctg tta tgc ggc aaa gat cat gtt tat cat gtg cca
Ala Trp Leu Leu Ser Gly Lys Asp His Val Tyr His Val Pro
255 260 265
```

```
ttg ccg gaa cac ggc gag nnn aag ctg ggg att cta gag
Leu Pro Glu His Gly Glu Xaa Lys Leu Gly Ile Leu Glu
270 275
```

```
act tac aca aag gaa cat tca gcg gaa tat caa tcg cag
Thr Tyr Thr Lys Glu His Ser Ala Glu Tyr Gln Ser Gln
280 285 290
```

Él se representa asimismo como la SEQ ID NO: 17. La secuencia de aminoácidos codificada por este marco de lectura se representa como la SEQ ID NO: 18. La posición 21 en la SEQ ID NO: 18 corresponde a la posición 272 de la SEQ ID NO: 2, 4, 6 o respectivamente 8.

5 Se prefieren unas moléculas de ácidos nucleicos, que codifican una secuencia de aminoácidos correspondiente por lo menos a las posiciones 252 hasta 291 de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8, o correspondiente por lo menos a las posiciones 202 hasta 341 de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8, o correspondiente por lo menos a las posiciones 152 hasta 391 de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8, o correspondiente por lo menos a las posiciones 102 hasta 441 de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8, o correspondiente por lo menos a las posiciones 52 hasta 491 de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8, o correspondiente por lo menos a las posiciones 2 hasta 495 de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8, o correspondiente por lo menos a las posiciones 2 hasta 496 de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8, o correspondiente por lo menos a las posiciones 2 hasta 497 de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8.

15 Un ejemplo de un marco de lectura conforme al invento que comprende un polinucleótido, que codifica la secuencia de aminoácidos correspondiente por lo menos a las posiciones 252 hasta 291 de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8, se expone a continuación:

```
gcg tgg ctg tta tgc ggc aaa gat cat gtt tat cat gtg cca
Ala Trp Leu Leu Ser Gly Lys Asp His Val Tyr His Val Pro
255 260 265
```

```
ttg ccg gaa cac ggc gag ctc aag ctg ggg att cta gag
Leu Pro Glu His Gly Glu Leu Lys Leu Gly Ile Leu Glu
270 275
```

```
act tac aca aag gaa cat tca gcg gaa tat caa tcg cag
Thr Tyr Thr Lys Glu His Ser Ala Glu Tyr Gln Ser Gln
280 285 290
```

20 El marco de lectura se representa asimismo como la SEQ ID NO: 19. La SEQ ID NO: 20 muestra la secuencia de aminoácidos codificada por este marco de lectura. La posición 21 en la SEQ ID NO: 20 corresponde a la posición 272 de la SEQ ID NO: 2, 4, 6 o respectivamente 8.

25 Se prefieren muy especialmente unas moléculas de ácidos nucleicos, que codifican 1.504 hasta 1.623 de la SEQ ID NO: 7, o una secuencia de nucleótidos correspondiente por lo menos a las posiciones 1.354 hasta 1.773 de la SEQ ID NO: 7, o una secuencia de nucleótidos correspondiente por lo menos a las posiciones 1.204 hasta 1.923 de la SEQ ID NO: 7, o una secuencia de nucleótidos correspondiente por lo menos a las posiciones 1.054 hasta 2.073 de la SEQ ID NO: 7, o una secuencia de nucleótidos correspondiente por lo menos a las posiciones 904 hasta 2.223 de la SEQ ID NO: 7, o una secuencia de nucleótidos correspondiente por lo menos a las posiciones 754 hasta 2.235 de la SEQ ID NO: 7, o una secuencia de nucleótidos correspondiente por lo menos a las posiciones 754 hasta 2.238 de la SEQ ID NO: 7, o una secuencia de nucleótidos correspondiente por lo menos a las posiciones 754 hasta 2.241 de la SEQ ID NO: 7.

35 Los marcos de lectura conformes al invento, tal como se muestran a modo de ejemplo en las SEQ ID NO: 17 y 19 como una secuencia de nucleótidos y en la SEQ ID NO: 18 y en la SEQ ID NO: 20 en forma de la secuencia de aminoácidos codificada, pueden contener además de esto una o varias mutaciones, que conducen a uno o varios intercambio(s) conservativo(s) de aminoácido(s). De manera preferida, las mutaciones conducen a como máximo un 4 %, a como máximo un 2 % o a como máximo un 1 % de intercambios conservativos de aminoácidos. Por lo demás, los marcos de lectura conformes al invento contienen una o varias mutaciones mudas. De manera preferida, los marcos de lectura conformes al invento contienen a lo sumo un 4 % y de manera especialmente preferida desde a lo sumo un 2 % hasta a lo sumo un 1 % de mutaciones mudas.

45 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.

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 denominación de "reemplazo de genes" (en inglés "gene replacement"). En el caso de este procedimiento, un fragmento de ADN, que contiene la mutación que interesa, es transferido a la deseada cepa 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 deseada cepa, o respectivamente la secuencia de un gen que está presente en la respectiva cepa, es intercambiada por la secuencia mutada.

Este método fue utilizado por Schwarzer y Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)) para incorporar un alelo de *lysA*, que llevaba una supresión y para incorporar un alelo de *lysA*, que llevaba una inserción, en el cromosoma de *C. glutamicum* en lugar del gen de tipo silvestre. Este método fue empleado por Schäfer y colaboradores (Gene 145, 69-73 (1994)) para incorporar una supresión en el operón *hom-thrB* de *C. glutamicum*. Este método fue empleado por Nakagawa y colaboradores (documento EP 1108790) y Ohnishi y colaboradores (Applied Microbiology and Biotechnology 58(2), 217-223 (2022)) 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 muestra 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 la secuencia de aminoácidos correspondiente por lo menos a las posiciones 252 hasta 291 de la SEQ ID NO: 6 o respectivamente 8, y que se representa como las SEQ ID NO: 17 y 19. La parte de la región codificadora correspondiente a las SEQ ID NO: 17 y 19 comprende una longitud de ≥ 120 nucleobases. Se prefieren aquellas partes de la SEQ ID NO: 7, que comprenden por lo menos la secuencia situada entre las posiciones 1.354 y 1.773, o por lo menos entre las posiciones 1.204 y 1.923, o por lo menos entre las posiciones 1.054 y 2.073, y que poseen de modo correspondiente una longitud de ≥ 420 , ≥ 720 o ≥ 1.020 nucleobases.

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 solamente 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 sucraza) de, por ejemplo, *Bacillus*, o el gen *galK* (gen de la galactosa cinasa) de, por ejemplo, *Escherichia coli*. (Por el concepto de "un gen, que actúa de un modo dominante negativo condicional" se entiende un gen, que en determinadas condiciones es desventajoso, por ejemplo tóxico, para el anfitrión, pero que en otras condiciones no tiene repercusiones negativas sobre el anfitrión que lleva el gen). Éstos hacen posible la selección en cuanto a unos sucesos de recombinación, en cuyos casos el vector es eliminado desde el cromosoma. Por lo demás, por Nakamura y colaboradores (documento US-A-6.303.2723) se describió un plásmido sensible frente a la temperatura para unas 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 una conjugación, por ejemplo según el método de Schäfer (Journal of Bacteriology 172, 1663-1666 (1990)) o mediante una transformación, por ejemplo según el método de Dunican y Shivan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) o según el método de Thierbach y colaboradores (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)). Eventualmente, la transferencia del ADN se puede conseguir 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 adecuado segundo 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 bórro Southern, de la reacción en cadena de la polimerasa, de 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 los métodos de la enzimología.

La descripción divulga, de un modo correspondiente, un procedimiento para la producción de una bacteria corineforme, en el que

- (a) un polinucleótido conforme al invento se transfiere a una bacteria corineforme,
- (b) el gen de la 2-metilcitrato deshidratasa que está presente en el cromosoma de la bacteria corineforme, que codifica una secuencia de aminoácidos con L-prolina en la posición 272 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 272 o en una posición comparable de la secuencia de aminoácidos otro L-aminoácido proteinógeno, de manera preferida L-leucina, y
- (c) se multiplica y reproduce la bacteria corineforme obtenida de acuerdo con las etapas a) y b).

De esta manera se obtiene una bacteria corineforme recombinante que, en lugar del gen prpD1 de tipo silvestre, contiene un (1) alelo de prpD1 conforme al invento.

Un procedimiento para la producción de un microorganismo consiste en que

- a) un polinucleótido conforme al invento, que codifica un polipéptido con una actividad enzimática de 2-metilcitrato deshidratasa, se transfiere a un microorganismo,
- b) el polinucleótido se replica en el microorganismo, y
- c) se multiplica y reproduce el microorganismo obtenido según las etapas a) y b).

De esta manera se obtiene un microorganismo recombinante, que contiene por lo menos una (1) copia o varias copias de un polinucleótido conforme al invento.

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. Un objeto del invento son igualmente unos microorganismos, que habían sido producidos mediante utilización de los polinucleótidos aislados. Tales microorganismos o bacterias se designan también como microorganismos recombinantes o como bacterias recombinantes. De igual manera, son un objeto del invento unos vectores, que contienen los polinucleótidos conformes al invento. Finalmente, son objeto del invento asimismo unos anfitriones, que contienen estos vectores.

Adicionalmente, para realizar la producción mejorada de L-aminoácidos, en particular de L-lisina, L-triptófano, L-valina, L-isoleucina y L-homoserina, puede ser ventajoso sobreexpresar en los mutantes o en las cepas recombinantes conformes al invento diversos genes. La utilización de unos genes endógenos es preferida por lo general.

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

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

- un gen dapA, que codifica una dihidrodipicolinato sintasa (DapA, nº de EC 4.2.1.52), tal como por ejemplo el gen dpaA del tipo silvestre de *Corynebacterium glutamicum*, que ha sido descrito en el documento EP 0 197 335,
- un gen lysA, que codifica una diaminopimelato descarboxilasa (LysA, nº de EC 4.1.1.20), tal como por ejemplo el gen lysA de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869, que ha sido descrito en el documento US 6.090.597,
- un gen zwf, que codifica una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Zwf, nº de EC 1.1.1.49), tal como por ejemplo el gen zwf del tipo silvestre de *Corynebacterium glutamicum*, que ha sido descrito en el documento JP-A-09224661 y en el documento EP-A-1108790,
- los alelos de zwf de *Corynebacterium glutamicum*, que han sido descritos en el documento de solicitud de patente de los EE.UU US-2003-0175911-A1, que codifican una proteína con una actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 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,

- un gen *pyc*, que codifica una piruvato carboxilasa (*Pyc*, nº de EC 6.4.1.1), tal como, por ejemplo, el gen *pyc* del tipo silvestre de *Corynebacterium glutamicum*, que ha sido descrito en el documento DE-A-198 31609 y en el documento EP 1108790,
- el alelo de *pyc* de *Corynebacterium glutamicum*, que ha sido descrito en el documento EP 1 108 790, que codifica una proteína con una actividad de piruvato carboxilasa, 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 han sido descritos en el documento WO 02/31158 y en particular en el documento EP1325135B1, que codifican unas proteínas con una actividad de piruvato carboxilasa, que llevan uno o varios de los intercambios de aminoácidos que se escogen entre el conjunto que se compone de L-valina reemplazada por L-metionina en la posición 1, 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 455 y de L-acido aspártico reemplazado por L-acido glutámico en la posición 1.120
- un gen *lysC* que codifica una aspartato cinasa (*LysC*, nº de EC 2.7.2.4), tal como por ejemplo el gen *lysC* del tipo silvestre de *Corynebacterium glutamicum*, que ha sido descrito como la SEQ ID NO: 281 en el documento EP-A-1108790 (véanse también los números de acceso AX120085 y 120365) y que ha sido descrito como la SEQ ID NO: 25 en el documento WO 01/00843 (véase el número de acceso AX063743),
- un alelo de *lysC*^{FBR} que codifica una variante de la aspartato cinasa que es 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*, como se ha descrito en el documento DE-A-195 48 222,
- el gen *aat* (el gen *aat* de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 ha sido descrito por ejemplo en la cita de Kalinowski y colaboradores (Journal of Biotechnology 104 (1-3), 5-25 (2003); véase también el número de acceso NC_006958), que codifica una aspartato aminotransferasa (*Aat*, nº de EC 2.6.1.1). Allí, él es designado como gen *aspB*. En el documento US 6.004.773, un gen que codifica una aspartato aminotransferasa es designado como *aspC*. Marienhagen y colaboradores (Journal of Bacteriology 187 (22), 7693-7646 (2005) designan al gen *aat* como el gen *aspT*)), y
- el gen *zwa1* del tipo silvestre de *Corynebacterium glutamicum* que codifica la proteína *Zwa1* (documento US 6.632.644).

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 *prpD1* o respectivamente unos polinucleótidos, que codifican unas 2-metilcitrato deshidratasa, que en la posición 272 de la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado contienen cualquier aminoácido proteinógeno estando exceptuada la L-prolina, siendo preferido el intercambio por L-leucina. Es conocido que mediante unas enzimas propias del anfitrión - las denominadas aminopeptidasas - se pueden separar desde el polipéptido formado unos aminoácidos terminales de N, en particular la metionina terminal de N. El mencionado aumento de la concentración o de la actividad de un producto génico se puede conseguir por ejemplo mediante el recurso de que se aumenta en por lo menos una copia el número de copias de los correspondientes polinucleótidos.

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)).

Otro método propagado para la consecución de una sobreexpresión es el procedimiento de la amplificación cromosómica 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.

En una forma de realización, tal como se ha descrito por ejemplo en la cita de Reinscheid y colaboradores (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132) (1994) para el operón *hom-thrB*, un plásmido, que no es replicativo en

C. glutamicum, el cual contiene el gen 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.

En otra forma de realización, que se describe en los documentos WO 03/040373 y 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.

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.

Finalmente, es posible aumentar el número de copias con ayuda de transposones y de elementos IS (véanse los documentos US 5.804.414 y US 5.591.577).

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)). De igual manera se pueden emplear las variantes del promotor de dapA que han sido descritas por Vasicova y colaboradores (Journal of Bacteriology 181, 6188-6191 (1999)), por ejemplo, el promotor A25. Por lo demás se puede utilizar el promotor gap de Corynebacterium glutamicum (véase el documento EP 06007373). Finalmente, 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 Aman y Brosius (Gene 40(2-3), 183-190 (1985)).

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 la 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.

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 previa 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 Herrmann 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, N.Y., 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 272: 2630-2647 (1999)).

Por lo demás, para la producción de L-lisina puede ser ventajoso, junto a la utilización de los alelos del gen prpD1 conformes al invento, eventualmente con una sobreexpresión simultánea de por lo menos uno de los genes escogidos entre el conjunto precedentemente mencionado, 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 (Pgi, nº de EC 5.3.1.9), tal como, por ejemplo, el gen pgi de Corynebacterium glutamicum, que ha sido descrito en los documentos US 6.586.214 y US 6.465.238,
- un gen hom que codifica la homoserina deshidrogenasa (Hom, nº de EC 1.1.1.3), tal como, por ejemplo, el gen hom de Corynebacterium glutamicum, que ha sido descrito en el documento EP-A-0131171,

- un gen thrB que codifica la homoserina cinasa (ThrB, nº de EC 2.7.1.39), 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
- un gen pfkB que codifica la fosfofructo cinasa (PfkB, nº de EC 2.7.1.56), tal como, por ejemplo, el gen pfkB de *Corynebacterium glutamicum*, que ha sido descrito en el documento WO 01/00844 (secuencia nº 57).
- un gen mdh que codifica la malato deshidrogenasa (Mdh, nº de EC 1.1.1.37), tal como se ha descrito a modo de ejemplo en el documento WO 02/02778,
- un gen mgo que codifica la malato-quinona oxidorreductasa (Mgo, nº de EC 1.1.99.16), tal como se ha descrito en los documentos US 7.094.106 y PCT/EP2005/057216.

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.

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.

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 (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. Las medidas técnicas mencionadas se llevan a cabo de manera preferida en la parte del extremo terminal en 5' de la región codificadora, que codifica el extremo terminal de N del polipéptido. Si se designa a la longitud total de un polipéptido (medida como el número de los L-aminoácidos unidos químicamente) como de 100 %, entonces - dentro del marco del presente invento - al extremo terminal de N del polipéptido pertenece la parte de la secuencia de aminoácidos, que, calculada a partir del aminoácido iniciador L-formil-metionina, contiene un 80 % de los siguientes L-aminoácidos.

Otras instrucciones para la producción de tales mutaciones pertenecen al estado de la técnica y se pueden deducir de los conocidos libros de texto 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), 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, Stuttgart, 1986). Otras medidas técnicas se describen en el estado de la técnica.

Un método para la disminución deliberada de la expresión génica consiste en poner al gen que debe de ser debilitado bajo el control de un promotor inducible mediante la adición de unas cantidades dosificadas de IPTG (isopropil-β-tiogalactopiranosido), tal como, por ejemplo, el promotor de trc o el promotor de tac. Para esto se adecuan unos vectores tales como, por ejemplo, el vector de expresión de *Escherichia coli* pXK99E (documento WO0226787; depositado de acuerdo con el Convenio de Budapest el 31 de julio del 2001 en DH5alpha/pXK99E como DSM14440 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares) (DSMZ, Braunschweig, Alemania)) o pVWEx2 (Wendisch, tesis doctoral Berichte des Forschungszentrums Jülich (Informes del Centro de Investigación Jülich), Jül-3397, ISSN 0994-2952, Jülich, Alemania (1997)), que hacen posible una expresión dependiente de IPTG del gen clonado en *Corynebacterium glutamicum*.

Este método se empleó, por ejemplo, en el documento de patente WO0226787 para la expresión regulada del gen deaD mediante integración del vector pXK99EdeaD en el genoma de *Corynebacterium glutamicum* y por Simic y

colaboradores (Applied and Environmental Microbiology 68: 3321-3327 (2002)) para la expresión regulada del gen *glyA* mediante integración del vector *pK18mobglyA'* en *Corynebacterium glutamicum*.

Otro método para la disminución específica de la expresión génica es la técnica antisentido, introduciéndose en las células diana unos oligodesoxinucleótidos o vectores cortos para la síntesis de un ARN antisentido más largo. El ARN antisentido se puede fijar allí a unos segmentos complementarios de unos ARNm específicos y disminuir su estabilidad o bloquear su traducibilidad. Un ejemplo de esto lo encontrará un experto en la especialidad en la cita de Srivastava y colaboradores (Applied Environmental Microbiology 2000 Oct; 66 (10): 4366 - 4371).

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

Por el concepto de "bacterias aisladas" se han de entender los mutantes y las bacterias recombinantes aislados/as o respectivamente producidos/as, conformes al invento, que contienen un alelo de *prpD1*, que codifica una 2-metilcitrato deshidratasa, que contiene el intercambio de aminoácidos que ha sido descrito en la posición 272 de la secuencia de aminoácidos.

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 unas combinaciones de éstos, es mejorado en por lo menos un 0,5 %, en por lo menos un 1 %, en por lo menos un 1,5 % o en por lo menos un 2 %, referido a la cepa de partida o respectivamente a la cepa parental o respectivamente al proceso de fermentación mediando utilización de las mismas.

Las bacterias corineformes aisladas, conformes al invento, se pueden cultivar continuamente - tal como se ha que ha sido 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 los 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 periphere Einrichtungen [Biorreactores y disposiciones periféricas] (editorial Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)).

El medio de cultivo o respectivamente el medio de fermentación que se ha de utilizar, debe de satisfacer de una manera apropiada las exigencias de las respectivas cepas. Unas descripciones de medios de cultivo de diferentes microorganismos están contenidas en el manual "Manual of Methods for General Bacteriology" [Manual de métodos para la bacteriología general] de la American Society for Bacteriology (Washington D.C., EE.UU., 1981). Los conceptos de un medio de cultivo, de un medio de fermentación de un medio nutritivo 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 más 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 unos ésteres poliglicólicos de ácidos grasos. Para la conservación de la estabilidad de unos 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 unas 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 sobrepresión 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 durante tanto tiempo 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 unos procedimientos continuos son posibles unos más largos períodos de tiempo de cultivación.

Unos adecuados medios de fermentación han sido descritos, 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, US 4.275.157 y US 4.224.409.

Unos métodos para la determinación de L-aminoácidos se conocen a partir del estado de la técnica. El análisis se puede efectuar, por ejemplo, tal como se ha descrito en la cita de Spackman y colaboradores (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) mediante una cromatografía 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 L-lisina, en cuyo caso

- 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 2-metilcitrato deshidratasa, conteniendo el polipéptido L-leucina en la posición correspondiente a la posición 272 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2
- o comprendiendo el polipéptido la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, en la que en la posición 272 está contenida L-leucina
- b) el L-aminoácido se acumula en el caldo de fermentación o en las células de la bacteria corineforme aislada.

A esto le sigue por regla general la recolección (en inglés "collecting") del L-aminoácido enriquecido en el medio nutritivo o respectivamente en el caldo de fermentación y/o en las células de las bacterias, con el fin de acceder a 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 final de la fermentación, el caldo de fermentación resultante contiene de modo correspondiente: a) la biomasa (masa celular) del microorganismo que ha resultado como consecuencia de la multiplicación 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.

5 Unos típicos caldos de fermentación que son adecuados para finalidades industriales, tienen típicamente un contenido de aminoácidos de 30 g/kg a 200 g/kg o 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.

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

15 Un conjunto de productos que contienen L-lisina 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 ha sido 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 unos 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 %.

25 En el caso de los aminoácidos L-valina, L-isoleucina, L-prolina, L-triptófano y L-homoserina, dentro del estado de la técnica se conocen esencialmente unas formas de productos, que contienen los respectivos aminoácidos en una forma purificada o pura (≥ 95 % en peso o ≥ 98 % en peso).

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

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

35 En el caso de la lisina, en el documento EP-B-0534865 se describe un procedimiento para la producción de soluciones acuosas, de carácter básico, que contienen L-lisina, a partir de unos 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 una cristalización a partir del caldo, y o bien se utilizan como fertilizantes o se desechan.

45 En el caso de los procedimientos para la producción de lisina mediando utilización de las bacterias conformes al invento, se prefieren también 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.

50 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.

55 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 2-metilcitrato deshidratasa, 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.

65 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 insignificantes 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 desde ≥ 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 (documento US 6.340.486 o US 6.465.025). Finalmente, el caldo se puede estabilizar también mediante una adición de bisulfito de sodio (NaHSO_3 , documento 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 que están 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 en por lo menos un 25 %, de manera especialmente preferida en por lo menos un 50 % y de manera muy especialmente preferida en por lo menos 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 unos métodos conocidos, tal 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, de desecación por atomización, de granulación por atomización o mediante unos procedimientos de otros tipos, tal como, por ejemplo, en la capa turbulenta circulante que ha sido 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 aísla a partir del granulado obtenido mediante un tamizado o una separación del polvo fino.

Asimismo, es posible secar el caldo de fermentación directamente, es decir, sin ningún precedente aumento de la concentración, mediante una desecación por atomización o una granulación por atomización.

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

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

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 de los tamaños 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 las partículas] de M. Rhodes, editorial Wiley & Sons (1998)).

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.

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

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

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

- 5 a) cultivación y fermentación de una bacteria corineforme que segrega un L-aminoácido, que contiene por lo menos un alelo de prpD1, que codifica un polipéptido con una actividad de 2-metilcitrato deshidratasa, que conteniendo el polipéptido L-leucina en la posición correspondiente a la posición 272 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o comprendiendo el polipéptido la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, en la que en la posición 272 está contenida L-leucina
- 10 b) eliminación de la biomasa que se ha formado durante la fermentación, en una proporción de 0 a 100 % en peso, y
- 15 c) 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 un L-aminoácido (proceso de aumento de concentración).

20 La descripción divulga también un procedimiento para la producción de un producto que contiene sulfato de lisina, que ha sido descrito en sus rasgos fundamentales en el documento DE 102006016158, y en cuyo caso el caldo de fermentación que se ha obtenido mediando utilización de los microorganismos conformes al invento, a partir del cual se había separado la biomasa eventualmente de un modo total o parcial, se transforma, mediante el recurso de que se lleva a cabo un procedimiento que comprende por lo menos las siguientes etapas:

- 25 a) se disminuye el valor del pH, mediante una adición de ácido sulfúrico, a 4,0 hasta 5,2, en particular a 4,9 hasta 5,1, y se ajusta de una relación molar de sulfato/L-lisina de 0,85 a 1,2, de manera preferida de 0,9 a 1,0, de manera especialmente preferida de $> 0,9$ a $< 0,95$, en el caldo de cultivo, eventualmente mediante la adición de uno o varios compuesto(s) que contienen sulfato y
- 30 b) se aumenta la concentración de la mezcla así obtenida mediante substracción de agua, y eventualmente se granula,
- 35 llevándose a cabo eventualmente antes de la etapa a) una o ambas de las siguientes medidas técnicas:
- c) medición de la relación molar de sulfato/L-lisina para la determinación de la cantidad requerida de un(os) compuesto(s) que contiene(n) sulfato
- 40 d) adición de un compuesto que contiene sulfato escogido entre el conjunto que se compone de sulfato de amonio, hidrógenosulfato de amonio y ácido sulfúrico en unas correspondientes relaciones.

Eventualmente, antes de la etapa b) se sigue añadiendo una sal del ácido sulfuroso, de manera preferida un hidrógenosulfito de metal alcalino, de manera especialmente preferida el hidrógenosulfito de sodio en una concentración de 0,01 a 0,5 % en peso, de manera preferida de 0,1 a 0,3 % en peso, de manera especialmente preferida de 0,1 a 0,2 % en peso, referida al caldo de fermentación.

Como unos preferidos compuestos que contienen sulfato, dentro del sentido de las etapas de procedimiento arriba mencionadas se han de mencionar en particular el sulfato de amonio y/o el hidrógenosulfato de amonio o unas correspondientes mezclas de amoniaco y ácido sulfúrico y el ácido sulfúrico por sí sólo.

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

Al realizar la granulación o compactación, es ventajoso el empleo de unas usuales sustancias auxiliares orgánicas o inorgánicas, o respectivamente de unos vehículos o soportes tales como almidones, gelatinas, derivados de celulosas o unas 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.

Por lo demás, 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 aumentada resistencia a la abrasión del producto y una disminución de la proporción de polvo fino. El contenido de aceite en el producto es de 0,02 a 2,0 % en peso, de manera preferida de 0,02 a 1,0 % en peso, y de manera muy especialmente preferida de 0,2 a 1,0 % en peso, referido a la cantidad total del aditivo para piensos.

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

Alternativamente, el producto se puede extender sin embargo también sobre un material de soporte o vehículo orgánico o inorgánico, conocido y usual en la elaboración de piensos, tal como, por ejemplo, ácidos silícicos, silicatos, materiales molidos, salvados, harinas, almidones, azúcares u otros, y/o se puede mezclar y estabilizar con unos usuales agentes espesantes o aglutinantes. Unos correspondientes ejemplos de usos y unos procedimientos para esto se describen en la bibliografía (Die Mühle + Mischfüttertechnik (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 unos 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.

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

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

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

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

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

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

como de 0,68 a 0,95, de manera preferida de 0,68 a 0,90, tal como ha sido descrito por Kushiki y colaboradores en el documento US 20030152633 (En los "[]" se indican las concentraciones molares).

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

En el caso de un aminoácido eléctricamente neutro, tal como el L-triptófano, el producto sólido constituido sobre la base del caldo de fermentación, que ha sido 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.

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

- a) un contenido de lisina (como la base) de 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.

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

- a) un contenido de triptófano de desde por lo menos 5 % en peso hasta como máximo 95 % en peso,
- b) un contenido de agua de a lo sumo 5 % en peso, y
- c) un contenido de biomasa correspondiente a por lo menos un 0,1 % de la biomasa contenida en el caldo de fermentación, siendo formada la biomasa eventualmente desactivada a partir de bacterias corineformes conformes al invento.

La cepa MH20-22B se depositó el 28 de octubre de 2004 en la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Alemania) como DSM 16835.

El mutante conforme al invento *Corynebacterium glutamicum* DM1916, que contiene L-leucina en la posición 272 de la secuencia de aminoácidos del polipéptido prpD1, se depositó el 15 de mayo de 2006 en la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Alemania) como DSM 18258.

El invento se describe seguidamente de una manera más detallada con ayuda de los siguientes Ejemplos de realización.

Ejemplo 1

Mutagénesis de la cepa DM416 que produce L-lisina

La cepa DM416 de *Corynebacterium glutamicum* se empleó como cepa de partida para la mutagénesis con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG). La cepa DM416 es un mutante de *Corynebacterium glutamicum* que requiere homoserina y leucina, y se ha depositado bajo la denominación ATCC21543 en la American Type Culture Collection (Manassas, VA, EE.UU.).

La cepa DM416 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 unas partes alícuotas se sembraron en placas sobre un agar de corazón y cerebro (de Merck, Darmstadt, Alemania). De esta manera se aislaron aproximadamente 4.000 mutantes.

Ejemplo 2

Ensayo de rendimiento de los mutantes de la cepa DM416

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

Para esto, los clones se multiplicaron primeramente sobre unas placas de agar de corazón y cerebro (de Merck, Darmstadt, Alemania) durante 24 horas a 33°C. Partiendo de estos cultivos en placas de agar, se inoculó en cada caso un cultivo previo (10 ml del medio en un matraz Erlenmeyer con una capacidad de 100 ml). Como medio para el cultivo previo se utilizó el medio MM. El cultivo previo se incubó durante 24 horas a 33°C y 240 rpm en un 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.

Medio MM

CSL	5 g/l
MOPS	20 g/l
Glucosa (autoclavada por separado)	50 g/l
Sales:	
(NH ₄) ₂ SO ₄	25 g/l
KH ₂ PO ₄	0,1 g/l
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1,0 g/l
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	10 mg/l
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	10 mg/l
MnSO ₄ * H ₂ O	5,0 mg/l
Biotina (filtrada en condiciones estériles)	0,3 mg/l
Tiamina * HCl (filtrada en condiciones estériles)	0,2 mg/l
L-leucina (filtrada en condiciones estériles)	0,2 g/l
L-homoserina (filtrada en condiciones estériles)	0,2 g/l
CaCO ₃	25 g/l

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

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

Después de 24 horas se determinó la densidad óptica (DO) en el caso de una longitud de onda de medición de 660 nm con el Biomek 1000 (de Beckmann Instruments GmbH, 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 DM1916.

Tabla 1

Cepa	DO (660)	Lisina-HCl (g/l)
DM416	6,3	1,43
DM1916	6,3	1,61

Ejemplo 3

Secuenciación del gen prpD1 del mutante DM1916

A partir del clon DM1916, con el método de Eikmanns y colaboradores (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) se aisló un ADN cromosómico. Con ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa se amplificó un fragmento de ADN, que lleva el gen prpD1 o respectivamente un alelo del mismo. A partir de la secuencia conocida para C.

glutamicum del gen prpD1 (la secuencia n° 770 del documento EP1108790) se escogieron los siguientes oligonucleótidos como cebadores:

prpD1_XL_A1 (SEQ ID NO: 9):
5' gcgaattcta aactgcgtga ggttggtg 3'

prpD1_XL_A2 (SEQ ID NO: 10):
5' gcgaattctc cccacatcaa caccattc 3'

Los cebadores representados fueron sintetizados por la entidad MWG Biotech (Ebersberg, Alemania) y la reacción PCR se llevó a cabo según el método clásico de PCR de Innis y colaboradores (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, 1990, Academic Press). Los cebadores hacen posible la amplificación de un fragmento de ADN que tiene una longitud de aproximadamente 1,63 kb (kilobases), que lleva el gen prpD1 o respectivamente un alelo del mismo. Además de ello, los cebadores contienen la secuencia para un sitio de corte de la endonucleasa de restricción EcoRI, que ha sido marcada mediante un subrayado en la secuencia de nucleótidos arriba representada.

El fragmento de ADN amplificado con una longitud de aproximadamente 1,63 kb, que lleva el alelo de prpD1 de la cepa DM1916, se identificó mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 %, se aisló a partir del gel y se purificó con los métodos usuales (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden).

La secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN amplificado o respectivamente del producto de la PCR fue determinada por la entidad Agowa (Berlín, Alemania) mediante una secuenciación. La secuencia del producto de la PCR está representada en la SEQ ID NO: 13. La secuencia de la región codificadora se representa adicionalmente en la SEQ ID NO: 5. La secuencia de aminoácidos de la correspondiente proteína metilcitrato deshidratasa, que se establece con ayuda del programa Patentin, está representada en la SEQ ID NO: 6.

En la posición 815 de la secuencia de nucleótidos de la región codificadora del alelo de prpD1 de la cepa DM1916 se encuentra la base timina (SEQ ID NO: 5). En la correspondiente posición del gen de tipo silvestre se encuentra la base citosina (SEQ ID NO: 1).

En la posición 272 de la secuencia de aminoácidos de la proteína metilcitrato deshidratasa de la cepa DM1916 se encuentra el aminoácido leucina (SEQ ID NO: 6). En la correspondiente posición de la proteína de tipo silvestre se encuentra el aminoácido prolina (SEQ ID NO: 2):

El alelo de prpD1, que contiene en la posición 815 de la región codificadora la base timina y que codifica de modo correspondiente una proteína de metilcitrato deshidratasa, que contiene el aminoácido leucina en la posición 272 de la secuencia de aminoácidos, se designa en lo sucesivo como el alelo de prpD1_P272L. En el caso de la designación "prpD1_P272L", P representa L-prolina, L representa L-leucina y 272 indica la posición del intercambio de aminoácidos (véanse las SEQ ID NO: 2 y 6).

El mutante de Corynebacterium glutamicum DM1916, que contiene L-leucina en la posición 272 de la secuencia de aminoácidos del polipéptido PrpD1, fue depositado el 15 de mayo de 2006 en la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Alemania) como DSM 18258.

Ejemplo 4

Intercambio del gen de tipo silvestre prpD1 de la cepa DM416 por el alelo de prpD1_P272L

4.1 Construcción del vector de intercambio pk18mobsacB_prpD1_P272L

El fragmento de ADN descrito en el Ejemplo 3, producido mediante una PCR, con una longitud de aproximadamente 1,63 kb, que lleva el alelo de prpD1_P272L, se introdujo mediante una mutagénesis por intercambio mediando toma de ayuda del sistema sacB descrito en la cita de Schäfer y colaboradores (Gene, 14, 69-73 (1994)) en el cromosoma de la cepa de C. glutamicum DM416 descrita en el Ejemplo 1. Este sistema hace posible la producción o respectivamente selección de unos intercambios de alelos, que se efectúan mediante una recombinación homóloga.

Para esto, el fragmento de prpD1_P272L con un tamaño de aproximadamente 1,63 kb se disoció con la endonucleasa de restricción EcoRI, se identificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 % y a continuación se aisló a partir del gel y se purificó con los métodos usuales (con el estuche QIAquick Gel Extraction Kit de la entidad Qiagen (Hilden, Alemania)).

El vector de clonación movilizable pK18mobsacB fue digerido con la enzima de restricción EcoRI y los extremos fueron desfosforilados con una fosfatasa alcalina (Alkaline Phosphatase, de Boehringer Mannheim, Alemania). El vector preparado previamente de esta manera se mezcló con el fragmento de prpD1_P272L con una longitud de

aproximadamente 1,63 kb y la tanda se trató con el estuche T4 DNA Ligase Kit (de Amersham-Pharmacia, Freiburg, Alemania).

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

El ADN de plásmido fue aislado a partir de un transformante con ayuda del estuche QIAprep Spin Miniprep Kit de la entidad Qiagen y fue comprobado mediante una disociación por restricción con la enzima PstI y mediante una subsiguiente electroforesis en un gel de agarosa. El plásmido es denominado pK18mobsacB_prpD1_P272L y se representa en la Figura 1.

4.2 Intercambio de alelos

El vector pK18mobsacB_prpD1_P272L mencionado en el Ejemplo 4.1 fue transferido por conjugación a la cepa DM416 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 DM416 y permanece conservado en la célula solamente cuando él se presenta integrado en el cromosoma como consecuencia de un suceso de recombinación. La selección de unos transconjugantes, es decir de unos clones con el pK18mobsacB_prpD1_P272L integrado, se efectuó mediante siembra en placas de la tanda de conjugación sobre un agar LB (Sambrook y colaboradores, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición Cold Spring Harbor, New York, 1989), que había sido suplementado con 15 mg/l de kanamicina y 50 mg/l de ácido nalidíxico. Los transconjugantes resistentes frente a kanamicina fueron extendidos como un frote sobre unas placas de agar LB con 25 mg/l de kanamicina, 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, con sacarosa al 10 %, y fueron incubados durante 16 horas.

El plásmido pK18mobsacB_prpD1_P272L, al igual que el plásmido de partida pK18mobsacB, junto al gen de resistencia a kanamicina, contiene una copia del gen sacB que codifica la levano sucraza procedente de *Bacillus subtilis*. La expresión inducible por sucrosa conduce a la formación de la levano sucraza, que cataliza la síntesis del producto levano, que es tóxico para *C. glutamicum*. Sobre un agar LB suplementado con sucrosa (= sacarosa) crecen por lo tanto sólo aquellos clones, en los que el pK18mobsacB_prpD1_P272L 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 en el caso de la escisión el intercambio de alelos o respectivamente la incorporación de la mutación, o la copia original permanece en el cromosoma del anfitrión.

Aproximadamente desde 40 hasta 50 clones fueron ensayados en cuanto al fenotipo "crecimiento en presencia de sucrosa" y "ausencia de crecimiento en presencia de kanamicina". En el caso de 4 colonias, que contenían el fenotipo "crecimiento en presencia de sucrosa" y "ausencia de crecimiento en presencia de kanamicina", se secuenció un segmento del gen prpD1, que cubre a la mutación P272L, partiendo del cebador de secuenciación pr1-2 (que corresponde a la secuencia de nucleótidos en las posiciones 424-443 de la región codificadora del gen prpD1 procedente de la SEQ ID NO: 1), de la entidad Agowa (Berlin, Alemania), con el fin de detectar si se presenta la mutación del alelo de prpD1_P272L en el cromosoma. El cebador pr1-2 utilizado fue sintetizado para esto por la entidad Agowa:

```
pr1-2:
5' ggt atc gcc act gcc tat ga 3'
```

De esta manera se identificó un clon, que en la posición 815 de la región codificadora del gen prpD1 contiene la base timina y que por consiguiente posee el alelo de prpD1_P272L. Este clon es designado como la cepa DM416prpD1_P272L.

Ejemplo 6

Comparación del rendimiento de la cepa DM416prpD1_P272L con la cepa de partida DM416.

El ensayo de rendimiento de la cepa DM416prpD1_P272L de *C. glutamicum* obtenida en el Ejemplo 5 se llevó a cabo tal como se ha descrito en el Ejemplo 2. El resultado del ensayo se representa en la Tabla 2.

Tabla 2

Cepa	DO (660 nm)	Lisina-HCl (g/l)
DM416	6,2	1,40
DM416prpD1_P272L	6,2	1,64

Breve descripción de la Figura:

5

Figura 1: Mapa del plásmido pK18mobsacB_prpD1_P272L.

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.

10

Kan: gen de resistencia a kanamicina

EcoRI: sitio de corte de la enzima de restricción EcoRI

15

PstI: sitio de corte de la enzima de restricción PstI

prpD1: alelo de prpD1_P272L

20

sacB: gen sacB

RP4-mob: región mob con el origen de la replicación para la transferencia (oriT)

oriV: origen de la replicación V

25

LISTA DE SECUENCIAS:

- <110> Evonik Degussa GmbH
- 5 <120> Alelos del gen prpD1 procedentes de bacterias corineformes
- <130> 2006E00233
- <160> 20
- 10 <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 1497
- 15 <212> ADN
- <213> Corynebacterium glutamicum
- <220>
- <221> CDS
- 20 <222> (1)..(1494)
- <223> gen prpD1 de tipo silvestre
- <220>
- <221> característica variada
- 25 <222> (815)..(815)
- <223> citosina

<400> 1

atg	cgc	atc	cac	gat	gtt	tat	acc	cac	ctt	tcg	gcc	gat	aac	ttt	ccc	48
Met	Arg	Ile	His	Asp	Val	Tyr	Thr	His	Leu	Ser	Ala	Asp	Asn	Phe	Pro	
1				5					10					15		
aaa	gca	gag	cac	ctt	gcg	tgg	aaa	ttc	tcc	gag	ctt	gcc	acc	gac	ccc	96
Lys	Ala	Glu	His	Leu	Ala	Trp	Lys	Phe	Ser	Glu	Leu	Ala	Thr	Asp	Pro	
			20					25					30			
gtg	gag	gtg	aca	ccg	gat	gtt	tcg	gag	atg	atc	atc	aac	cgg	atc	atc	144
Val	Glu	Val	Thr	Pro	Asp	Val	Ser	Glu	Met	Ile	Ile	Asn	Arg	Ile	Ile	
		35					40					45				
gac	aac	gcg	gcg	gtg	tct	gcc	gcg	tcg	gtg	ttg	cgc	cgg	cct	gtg	act	192
Asp	Asn	Ala	Ala	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Val	Leu	Arg	Arg	Pro	Val	Thr	
	50					55					60					
gtg	gcc	agg	caa	caa	gcg	cag	tcc	cat	ccg	cgg	gaa	aag	ggc	gga	aaa	240
Val	Ala	Arg	Gln	Gln	Ala	Gln	Ser	His	Pro	Arg	Glu	Lys	Gly	Gly	Lys	
					70					75					80	
gtt	ttt	gga	att	tca	ggc	agc	tac	tca	cca	gag	tgg	gct	gcc	ttt	gct	288
Val	Phe	Gly	Ile	Ser	Gly	Ser	Tyr	Ser	Pro	Glu	Trp	Ala	Ala	Phe	Ala	
				85					90					95		
aat	ggt	gtg	gcc	gta	cgt	gaa	ttg	gac	ttc	cac	gat	aca	ttt	tta	gca	336
Asn	Gly	Val	Ala	Val	Arg	Glu	Leu	Asp	Phe	His	Asp	Thr	Phe	Leu	Ala	
			100					105					110			
gct	gaa	tac	tcc	cat	ccc	ggc	gac	aat	att	cca	cca	ctt	ctt	gca	gta	384
Ala	Glu	Tyr	Ser	His	Pro	Gly	Asp	Asn	Ile	Pro	Pro	Leu	Leu	Ala	Val	
		115					120					125				
gcg	cag	gct	cag	aga	agc	agc	ggc	agg	gat	ctc	att	cgg	ggt	atc	gcc	432
Ala	Gln	Ala	Gln	Arg	Ser	Ser	Gly	Arg	Asp	Leu	Ile	Arg	Gly	Ile	Ala	
		130				135					140					
act	gcc	tat	gag	gtg	cag	gtg	gaa	ttg	gtg	agg	ggg	atc	tgc	ttg	cat	480
Thr	Ala	Tyr	Glu	Val	Gln	Val	Glu	Leu	Val	Arg	Gly	Ile	Cys	Leu	His	
					150					155					160	

gag	cac	aaa	att	gat	cac	gta	gcc	cac	ctt	ggt	ccc	agc	gct	gca	gcg	528
Glu	His	Lys	Ile	Asp	His	Val	Ala	His	Leu	Gly	Pro	Ser	Ala	Ala	Ala	
				165					170					175		
ggt	ttg	ggc	acg	ttg	ttg	cat	gta	gat	gag	gaa	acc	atc	tac	cag	gcg	576
Gly	Leu	Gly	Thr	Leu	Leu	His	Val	Asp	Glu	Glu	Thr	Ile	Tyr	Gln	Ala	
			180					185					190			
atc	ggc	cag	gca	ttg	cac	acc	acg	acg	gct	acg	agg	cag	tcg	cga	aaa	624
Ile	Gly	Gln	Ala	Leu	His	Thr	Thr	Thr	Ala	Thr	Arg	Gln	Ser	Arg	Lys	
		195					200					205				
ggt	gag	att	tcc	agc	tgg	aag	gcg	ttc	gcg	cca	gcg	ttt	gcg	gga	aag	672
Gly	Glu	Ile	Ser	Ser	Trp	Lys	Ala	Phe	Ala	Pro	Ala	Phe	Ala	Gly	Lys	
	210					215					220					
atg	gcc	att	gag	gcg	atg	gat	cgt	gcg	atg	cgt	ggg	gag	ggt	tcg	ccc	720
Met	Ala	Ile	Glu	Ala	Met	Asp	Arg	Ala	Met	Arg	Gly	Glu	Gly	Ser	Pro	
	225				230					235					240	
gca	ccg	att	tgg	gag	ggc	gaa	gac	ggg	gtc	atc	gcg	tgg	ctg	tta	tcg	768
Ala	Pro	Ile	Trp	Glu	Gly	Glu	Asp	Gly	Val	Ile	Ala	Trp	Leu	Leu	Ser	
				245					250					255		
ggc	aaa	gat	cat	gtt	tat	cat	gtg	cca	ttg	ccg	gaa	cac	ggc	gag	ccc	816
Gly	Lys	Asp	His	Val	Tyr	His	Val	Pro	Leu	Pro	Glu	His	Gly	Glu	Pro	
			260					265					270			
aag	ctg	ggg	att	cta	gag	act	tac	aca	aag	gaa	cat	tca	gcg	gaa	tat	864
Lys	Leu	Gly	Ile	Leu	Glu	Thr	Tyr	Thr	Lys	Glu	His	Ser	Ala	Glu	Tyr	
		275					280					285				
caa	tcg	cag	gca	ccg	att	gat	ctg	gcg	cg	agg	atg	aag	cca	ctg	gtt	912
Gln	Ser	Gln	Ala	Pro	Ile	Asp	Leu	Ala	Arg	Arg	Met	Lys	Pro	Leu	Val	
	290					295					300					
gac	gcg	gct	ggc	gga	acg	gaa	cac	att	gca	gag	att	gtg	ctg	cg	acc	960
Asp	Ala	Ala	Gly	Gly	Thr	Glu	His	Ile	Ala	Glu	Ile	Val	Leu	Arg	Thr	
					310					315					320	
agt	cac	cac	acg	cat	tat	gtg	att	ggc	act	ggg	gcg	aac	gat	ccg	cag	1008
Ser	His	His	Thr	His	Tyr	Val	Ile	Gly	Thr	Gly	Ala	Asn	Asp	Pro	Gln	
				325					330					335		
aag	atg	gat	ccg	cag	gcc	tcg	cgt	gaa	acc	ctg	gat	cat	tcc	atc	atg	1056
Lys	Met	Asp	Pro	Gln	Ala	Ser	Arg	Glu	Thr	Leu	Asp	His	Ser	Ile	Met	
			340					345					350			
tac	att	ttc	gcc	gtc	gcg	ctt	caa	gat	ggc	gtg	tgg	cac	cac	gag	ttt	1104
Tyr	Ile	Phe	Ala	Val	Ala	Leu	Gln	Asp	Gly	Val	Trp	His	His	Glu	Phe	
		355					360					365				
tcc	tac	acc	cg	aag	cgt	tcc	acc	cg	ccg	gaa	act	gtg	gag	ctg	tgg	1152
Ser	Tyr	Thr	Arg	Lys	Arg	Ser	Thr	Arg	Pro	Glu	Thr	Val	Glu	Leu	Trp	
	370					375					380					
cac	aag	att	cg	acc	gtg	gag	gat	cct	gaa	tgg	acg	cg	cga	tac	cat	1200
His	Lys	Ile	Arg	Thr	Val	Glu	Asp	Pro	Glu	Trp	Thr	Arg	Arg	Tyr	His	
					390					395					400	
tct	gat	gat	cct	gca	aaa	aag	gcc	ttt	ggt	gcg	aaa	gca	gtg	atc	aca	1248
Ser	Asp	Asp	Pro	Ala	Lys	Lys	Ala	Phe	Gly	Ala	Lys	Ala	Val	Ile	Thr	
				405					410					415		
atg	gct	gat	ggc	acc	gtg	att	gag	gat	gaa	ttg	gct	gtc	gcg	gat	gcc	1296
Met	Ala	Asp	Gly	Thr	Val	Ile	Glu	Asp	Glu	Leu	Ala	Val	Ala	Asp	Ala	
			420					425					430			
cac	ccg	ctg	ggt	gct	cgg	ccg	ttt	gcg	cgg	gag	aat	tac	att	gaa	aaa	1344

His Pro Leu Gly Ala Arg Pro Phe Ala Arg Glu Asn Tyr Ile Glu Lys
 435 440 445
 ttc cgc aca ctc gcg cag ggg att gtc att gat tca gaa cag gaa cgc 1392
 Phe Arg Thr Leu Ala Gln Gly Ile Val Ile Asp Ser Glu Gln Glu Arg
 450 455 460
 ttc ttg cat gcc gtg caa agc ctg cct gac ctg gat gat ctt gat cag 1440
 Phe Leu His Ala Val Gln Ser Leu Pro Asp Leu Asp Asp Leu Asp Gln
 465 470 475 480
 ctc aac atc gaa gtc gac ata agc aac cag gcc gcg acg aaa gcg ggg 1488
 Leu Asn Ile Glu Val Asp Ile Ser Asn Gln Ala Ala Thr Lys Ala Gly
 485 490 495
 ctg tta tga 1497
 Leu Leu

<210> 2

<211> 498

<212> PRT

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 2

Met Arg Ile His Asp Val Tyr Thr His Leu Ser Ala Asp Asn Phe Pro
 1 5 10 15

Lys Ala Glu His Leu Ala Trp Lys Phe Ser Glu Leu Ala Thr Asp Pro
 20 25 30

Val Glu Val Thr Pro Asp Val Ser Glu Met Ile Ile Asn Arg Ile Ile
 35 40 45

Asp Asn Ala Ala Val Ser Ala Ala Ser Val Leu Arg Arg Pro Val Thr
 50 55 60

Val Ala Arg Gln Gln Ala Gln Ser His Pro Arg Glu Lys Gly Gly Lys
 65 70 75 80

Val Phe Gly Ile Ser Gly Ser Tyr Ser Pro Glu Trp Ala Ala Phe Ala
 85 90 95

Asn Gly Val Ala Val Arg Glu Leu Asp Phe His Asp Thr Phe Leu Ala
 100 105 110

Ala Glu Tyr Ser His Pro Gly Asp Asn Ile Pro Pro Leu Leu Ala Val
 115 120 125

Ala Gln Ala Gln Arg Ser Ser Gly Arg Asp Leu Ile Arg Gly Ile Ala
 130 135 140

Thr Ala Tyr Glu Val Gln Val Glu Leu Val Arg Gly Ile Cys Leu His
 145 150 155 160

Glu His Lys Ile Asp His Val Ala His Leu Gly Pro Ser Ala Ala Ala
 165 170 175

Gly Leu Gly Thr Leu Leu His Val Asp Glu Glu Thr Ile Tyr Gln Ala
 180 185 190
 Ile Gly Gln Ala Leu His Thr Thr Thr Ala Thr Arg Gln Ser Arg Lys
 195 200 205
 Gly Glu Ile Ser Ser Trp Lys Ala Phe Ala Pro Ala Phe Ala Gly Lys
 210 215 220
 Met Ala Ile Glu Ala Met Asp Arg Ala Met Arg Gly Glu Gly Ser Pro
 225 230 235 240
 Ala Pro Ile Trp Glu Gly Glu Asp Gly Val Ile Ala Trp Leu Leu Ser
 245 250 255
 Gly Lys Asp His Val Tyr His Val Pro Leu Pro Glu His Gly Glu Pro
 260 265 270
 Lys Leu Gly Ile Leu Glu Thr Tyr Thr Lys Glu His Ser Ala Glu Tyr
 275 280 285
 Gln Ser Gln Ala Pro Ile Asp Leu Ala Arg Arg Met Lys Pro Leu Val
 290 295 300
 Asp Ala Ala Gly Gly Thr Glu His Ile Ala Glu Ile Val Leu Arg Thr
 305 310 315 320
 Ser His His Thr His Tyr Val Ile Gly Thr Gly Ala Asn Asp Pro Gln
 325 330 335
 Lys Met Asp Pro Gln Ala Ser Arg Glu Thr Leu Asp His Ser Ile Met
 340 345 350
 Tyr Ile Phe Ala Val Ala Leu Gln Asp Gly Val Trp His His Glu Phe
 355 360 365
 Ser Tyr Thr Arg Lys Arg Ser Thr Arg Pro Glu Thr Val Glu Leu Trp
 370 375 380
 His Lys Ile Arg Thr Val Glu Asp Pro Glu Trp Thr Arg Arg Tyr His
 385 390 395 400
 Ser Asp Asp Pro Ala Lys Lys Ala Phe Gly Ala Lys Ala Val Ile Thr
 405 410 415
 Met Ala Asp Gly Thr Val Ile Glu Asp Glu Leu Ala Val Ala Asp Ala
 420 425 430
 His Pro Leu Gly Ala Arg Pro Phe Ala Arg Glu Asn Tyr Ile Glu Lys
 435 440 445

Phe Arg Thr Leu Ala Gln Gly Ile Val Ile Asp Ser Glu Gln Glu Arg
450 455 460

Phe Leu His Ala Val Gln Ser Leu Pro Asp Leu Asp Asp Leu Asp Gln
465 470 475 480

Leu Asn Ile Glu Val Asp Ile Ser Asn Gln Ala Ala Thr Lys Ala Gly
485 490 495

Leu Leu

<210> 3

<221> 3000

<222> ADN

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> característica variada

<222> (1) .. (750)

10 <223> secuencia situada corriente arriba de la CDS

<220>

<221> CDS

<222> (751)..(2244)

15 <223> gen prpD1 de tipo silvestre

<220>

<221> característica variada

<222> (1565)..(1565)

20 <223> citosina

<220>

<221> característica variada

<222> (2245)..(3000)

25 <223> secuencia situada corriente arriba de la CDS

<400> 3

```

ggttcacct tgcataac gcttgacgac gcctccctcc ttcactctcg gcgcatcatt      60
ttggcccacg gcgccgttga cgatctgccag gaggtagaag gactgtcaga tttttgggga      120
accaaagtgt tgcactgcgc ttactgccac ggctttgagg cccgcgattc tgaaatcgct      180
gtggtgggta cctcgcccat ggctgcgcac caagcggtga tgttctcgca gttgtccaaa      240
actgtcagct tgggtgggcac gatcgacatt gatgaacaaa ccagcgagag cctagatagt      300
gctggagtaa aagtgttggg caccaatgcg gtgcgcgtat ccgccgaagg tgatggcctg      360
tctgtggaac tgtccgaagg cgatcattta agctgcgaca acatcgtggt ggcattctcg      420
ccactggtgg atggcacgct gtacacccaa cttggtggtc agatggaaga aaacccgatg      480
ggcaggttca ttccaggtac ccaaaccggg cgactccta ttgaagggtg gtgggctgcc      540
ggaaacgcgc aagctcccat ggcgatggtc tatggttccg ctgctcaagg cgtgatggct      600
ggagcagaga tcaactttga tctgatcctg gaagatattt ccgtggcaag cgcgagagc      660
taaactgcgt gaggttgtgg cctgtcacac ataatcggcc tagggtggga ctttaaggaa      720
acagtcaca aataaatctc aaggagcccc atg cgc atc cac gat gtt tat acc      774

```

Met Arg Ile His Asp Val Tyr Thr																
1 5																
cac His	ctt Leu 10	tcg Ser	gcc Ala	gat Asp	aac Asn	ttt Phe 15	ccc Pro	aaa Lys	gca Ala	gag Glu	cac His 20	ctt Leu	gcg Ala	tgg Trp	aaa Lys	822
ttc Phe 25	tcc Ser	gag Glu	ctt Leu	gcc Ala	acc Thr 30	gac Asp	ccc Pro	gtg Val	gag Glu	gtg Val 35	aca Thr	ccg Pro	gat Asp	gtt Val	tcg Ser 40	870
gag Glu	atg Met	atc Ile	atc Ile	aac Asn 45	cgg Arg	atc Ile	atc Ile	gac Asp	aac Asn 50	gcg Ala	gcg Ala	gtg Val	tct Ser	gcc Ala 55	gcg Ala	918
tcg Ser	gtg Val	ttg Leu	cgc Arg 60	cgg Arg	cct Pro	gtg Val	act Thr	gtg Val 65	gcc Ala	agg Arg	caa Gln	caa Gln	gcg Ala 70	cag Gln	tcc Ser	966
cat His	ccg Pro	cgg Arg 75	gaa Glu	aag Lys	ggc Gly	gga Gly	aaa Lys 80	gtt Val	ttt Phe	gga Gly	att Ile	tca Ser 85	ggc Gly	agc Ser	tac Tyr	1014
tca Ser	cca Pro 90	gag Glu	tgg Trp	gct Ala	gcc Ala	ttt Phe 95	gct Ala	aat Asn	ggg Gly	gtg Val	gcc Ala 100	gta Val	cgt Arg	gaa Glu	ttg Leu	1062
gac Asp 105	ttc Phe	cac His	gat Asp	aca Thr	ttt Phe 110	tta Leu	gca Ala	gct Ala	gaa Glu	tac Tyr 115	tcc Ser	cat His	ccc Pro	ggc Gly	gac Asp 120	1110
aat Asn	att Ile	cca Pro	cca Pro	ctt Leu 125	ctt Leu	gca Ala	gta Val	gcg Ala	cag Gln 130	gct Ala	cag Gln	aga Arg	agc Ser	agc Ser 135	ggc Gly	1158
agg Arg	gat Asp	ctc Leu	att Ile 140	cgg Arg	ggg Gly	atc Ile	gcc Ala	act Thr 145	gcc Ala	tat Tyr	gag Glu	gtg Val	cag Gln 150	gtg Val	gaa Glu	1206
ttg Leu	gtg Val	agg Arg 155	ggg Gly	atc Ile	tgc Cys	ttg Leu	cat His 160	gag Glu	cac His	aaa Lys	att Ile	gat Asp 165	cac His	gta Val	gcc Ala	1254
cac His	ctt Leu 170	ggg Gly	ccc Pro	agc Ser	gct Ala	gca Ala 175	gcg Ala	ggg Gly	ttg Leu	ggc Gly	acg Thr 180	ttg Leu	ttg Leu	cat His	gta Val	1302
gat Asp 185	gag Glu	gaa Glu	acc Thr	atc Ile	tac Tyr 190	cag Gln	gcg Ala	atc Ile	ggc Gly	cag Gln 195	gca Ala	ttg Leu	cac His	acc Thr	acg Thr 200	1350
acg Thr	gct Ala	acg Thr	agg Arg	cag Gln 205	tcg Ser	cga Arg	aaa Lys	ggg Gly	gag Glu 210	att Ile	tcc Ser	agc Ser	tgg Trp	aag Lys 215	gcg Ala	1398
ttc Phe	gcg Ala	cca Pro	gcg Ala 220	ttt Phe	gcg Ala	gga Gly	aag Lys	atg Met 225	gcc Ala	att Ile	gag Glu	gcg Ala	atg Met 230	gat Asp	cgt Arg	1446
gcg Ala	atg Met	cgt Arg 235	ggg Gly	gag Glu	ggg Gly	tcg Ser	ccc Pro 240	gca Ala	ccg Pro	att Ile	tgg Trp	gag Glu 245	ggc Gly	gaa Glu	gac Asp	1494
ggg Gly	gtc Val 250	atc Ile	gcg Ala	tgg Trp	ctg Leu	tta Leu 255	tcg Ser	ggc Gly	aaa Lys	gat Asp	cat His 260	gtt Val	tat Tyr	cat His	gtg Val	1542
cca Pro	ttg Leu	ccg Pro	gaa Glu	cac His	ggc Gly	gag Glu	ccc Pro	aag Lys	ctg Leu	ggg Gly	att Ile	cta Leu	gag Glu	act Thr	tac Tyr	1590

265	270	275	280	
aca aag gaa cat tca gcg gaa tat caa tcg cag gca ccg att gat ctg	Thr Lys Glu His Ser 285	Ala Glu Tyr Gln Ser 290	Gln Ala Pro Ile Asp 295	1638
gcg cgc agg atg aag cca ctg gtt gac gcg gct ggc gga acg gaa cac	Ala Arg Arg Met 300	Lys Pro Leu Val Asp 305	Ala Ala Gly Gly Thr 310	1686
att gca gag att gtg ctg cgc acc agt cac cac acg cat tat gtg att	Ile Ala Glu Ile Val Leu Arg Thr 320	Ser His His Thr His 325	Tyr Val Ile	1734
ggc act ggg gcg aac gat ccg cag aag atg gat ccg cag gcc tcg cgt	Gly Thr 330	Gly Ala Asn Asp 335	Pro Gln Ala Ser Arg 340	1782
gaa acc ctg gat cat tcc atc atg tac att ttc gcc gtc gcg ctt caa	Glu Thr Leu Asp His Ser 350	Ile Met Tyr Ile Phe 355	Ala Val Ala Leu Gln 360	1830
gat ggc gtg tgg cac cac gag ttt tcc tac acc cgc aag cgt tcc acc	Asp Gly Val Trp His 365	His Glu Phe Ser Tyr 370	Thr Arg Lys Arg Ser 375	1878
cgc ccg gaa act gtg gag ctg tgg cac aag att cgc acc gtg gag gat	Arg Pro Glu Thr Val 380	Glu Leu Trp His 385	Lys Ile Arg Thr Val 390	1926
cct gaa tgg acg cgc cga tac cat tct gat gat cct gca aaa aag gcc	Pro Glu Trp Thr Arg Arg Tyr His 400	Ser Asp Asp Pro Ala Lys Lys Ala 405		1974
ttt ggt gcg aaa gca gtg atc aca atg gct gat ggc acc gtg att gag	Phe Gly Ala Lys Ala Val Ile Thr Met Ala Asp 420	Gly Thr Val Ile Glu 410		2022
gat gaa ttg gct gtc gcg gat gcc cac ccg ctg ggt gct cgg ccg ttt	Asp Glu Leu Ala Val Ala Asp Ala His Pro Leu Gly Ala Arg Pro Phe 440	425		2070
gcg cgg gag aat tac att gaa aaa ttc cgc aca ctc gcg cag ggg att	Ala Arg Glu Asn Tyr Ile Glu Lys Phe Arg Thr Leu Ala Gln Gly Ile 455	445		2118
gtc att gat tca gaa cag gaa cgc ttc ttg cat gcc gtg caa agc ctg	Val Ile Asp Ser Glu Gln Glu Arg Phe Leu His Ala Val Gln Ser Leu 470	460		2166
cct gac ctg gat gat ctt gat cag ctc aac atc gaa gtc gac ata agc	Pro Asp Leu Asp Asp Leu Asp Gln Leu Asn Ile Glu Val Asp Ile Ser 485	475		2214
aac cag gcc gcg acg aaa gcg ggg ctg tta tgaatctctt ttcgaatggt	Asn Gln Ala Ala Thr Lys Ala Gly Leu Leu 495	490		2264
gttgatgtgg ggaggcgtcg acaagcattt aaagcggcac tcgccgcacc ccacatcgcc				2324
cggctgcccc gcgcattctc ccctctgatt gcgcgctcca tcgaagaagc cggcttcgaa				2384
ggcgtctacg tttccggcgc cgtcatagct gctgacctgg cactacccga tatcggcttg				2444
acgacgctga ccgaagtcgc ccaccgcgcg cggcaaattg cgcgcgtcac agacctagga				2504
gtgcttgctg acgccgacac cggctttggc gaacccatgt cggccgcacg caccgtcgcc				2564
gaattggagg acgccggtgt ggccggatgc caccttgaag accaagtcaa ccccaaacgt				2624

tgcgggcact tggacggcaa agaagtcgtg cgcacagacg tgatggttcg acgcatcgca 2684
 gccgccgtct cggccccggcg cgacccgaac tttgtcatct gcgcccgcac cgacgccgct 2744
 ggagtggaag gaatcgacgc cgccattgag cgcgcgaaag cctacttaga tgcggggcgcc 2804
 gacatgattt tcaccgaagc cctccacagc gaagccgact tccgatactt ccggcacgcc 2864
 atccctgatg ccttgttgct ggcgaatatg accgaatttg gcaaaacgac gctgctgtca 2924
 gccgacgtgt tggaagagat tggctacaac gccgtgatct accccgtgac cacgctgcgt 2984
 attgccatgg gacaag 3000

<210> 4

<211> 498

<212> PRT

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 4

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

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

Phe Leu His Ala Val Gln Ser Leu Pro Asp Leu Asp Asp Leu Asp Gln
465 470 475 480

Leu Asn Ile Glu Val Asp Ile Ser Asn Gln Ala Ala Thr Lys Ala Gly
485 490 495

Leu Leu

<210> 5

<211> 1497

<212> ADN

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1494) .

10 <223> alelo de prpD1

<220>

<221> mutación

<222> (815) .. (815)

15 <223> transición C -> T

<400> 5

atg cgc atc cac gat gtt tat acc cac ctt tcg gcc gat aac ttt ccc 48
Met Arg Ile His Asp Val Tyr Thr His Leu Ser Ala Asp Asn Phe Pro
1 5 10 15

aaa gca gag cac ctt gcg tgg aaa ttc tcc gag ctt gcc acc gac ccc 96
Lys Ala Glu His Leu Ala Trp Lys Phe Ser Glu Leu Ala Thr Asp Pro
20 25 30

gtg gag gtg aca ccg gat gtt tcg gag atg atc atc aac cgg atc atc 144
Val Glu Val Thr Pro Asp Val Ser Glu Met Ile Ile Asn Arg Ile Ile
35 40 45

gac aac gcg gcg gtg tct gcc gcg tcg gtg ttg cgc cgg cct gtg act 192
Asp Asn Ala Ala Val Ser Ala Ala Ser Val Leu Arg Arg Pro Val Thr
50 55 60

gtg gcc agg caa caa gcg cag tcc cat ccg cgg gaa aag ggc gga aaa 240
Val Ala Arg Gln Gln Ala Gln Ser His Pro Arg Glu Lys Gly Gly Lys
65 70 75 80

gtt ttt gga att tca ggc agc tac tca cca gag tgg gct gcc ttt gct 288
Val Phe Gly Ile Ser Gly Ser Tyr Ser Pro Glu Trp Ala Ala Phe Ala
85 90 95

aat ggt gtg gcc gta cgt gaa ttg gac ttc cac gat aca ttt tta gca 336
Asn Gly Val Ala Val Arg Glu Leu Asp Phe His Asp Thr Phe Leu Ala
100 105 110

gct gaa tac tcc cat ccc ggc gac aat att cca cca ctt ctt gca gta 384
Ala Glu Tyr Ser His Pro Gly Asp Asn Ile Pro Pro Leu Leu Ala Val
115 120 125

gcg cag gct cag aga agc agc ggc agg gat ctc att cgg ggt atc gcc 432
Ala Gln Ala Gln Arg Ser Ser Gly Arg Asp Leu Ile Arg Gly Ile Ala
130 135 140

act gcc tat gag gtg cag gtg gaa ttg gtg agg ggg atc tgc ttg cat 480
Thr Ala Tyr Glu Val Gln Val Glu Leu Val Arg Gly Ile Cys Leu His
145 150 155 160

gag Glu	cac His	aaa Lys	att Ile	gat Asp 165	cac His	gta Val	gcc Ala	cac His	ctt Leu 170	ggt Gly	ccc Pro	agc Ser	gct Ala	gca Ala 175	gcg Ala	528
ggt Gly	ttg Leu	ggc Gly	acg Thr 180	ttg Leu	ttg Leu	cat His	gta Val	gat Asp 185	gag Glu	gaa Glu	acc Thr	atc Ile	tac Tyr 190	cag Gln	gcg Ala	576
atc Ile	ggc Gly	cag Gln 195	gca Ala	ttg Leu	cac His	acc Thr	acg Thr 200	acg Thr	gct Ala	acg Thr	agg Arg	cag Gln 205	tcg Ser	cga Arg	aaa Lys	624
ggt Gly	gag Glu 210	att Ile	tcc Ser	agc Ser	tgg Trp	aag Lys 215	gcg Ala	ttc Phe	gcg Ala	cca Pro	gcg Ala 220	ttt Phe	gcg Ala	gga Gly	aag Lys	672
atg Met 225	gcc Ala	att Ile	gag Glu	gcg Ala	atg Met 230	gat Asp	cgt Arg	gcg Ala	atg Met	cgt Arg 235	ggg Gly	gag Glu	ggt Gly	tcg Ser	ccc Pro 240	720
gca Ala	ccg Pro	att Ile	tgg Trp	gag Glu 245	ggc Gly	gaa Glu	gac Asp	ggg Gly	gtc Val 250	atc Ile	gcg Ala	tgg Trp	ctg Leu	tta Leu 255	tcg Ser	768
ggc Gly	aaa Lys	gat Asp	cat His 260	gtt Val	tat Tyr	cat His	gtg Val	cca Pro 265	ttg Leu	ccg Pro	gaa Glu	cac His	ggc Gly 270	gag Glu	ctc Leu	816
aag Lys	ctg Leu	ggg Gly 275	att Ile	cta Leu	gag Glu	act Thr	tac Tyr 280	aca Thr	aag Lys	gaa Glu	cat His	tca Ser 285	gcg Ala	gaa Glu	tat Tyr	864
caa Gln	tcg Ser 290	cag Gln	gca Ala	ccg Pro	att Ile	gat Asp 295	ctg Leu	gcg Ala	cgc Arg	agg Arg	atg Met 300	aag Lys	cca Pro	ctg Leu	gtt Val	912
gac Asp 305	gcg Ala	gct Ala	ggc Gly	gga Gly	acg Thr 310	gaa Glu	cac His	att Ile	gca Ala	gag Glu 315	att Ile	gtg Val	ctg Leu	cgc Arg	acc Thr 320	960
agt Ser	cac His	cac His	acg Thr	cat His 325	tat Tyr	gtg Val	att Ile	ggc Gly	act Thr 330	ggg Gly	gcg Ala	aac Asn	gat Asp	ccg Pro 335	cag Gln	1008
aag Lys	atg Met	gat Asp	ccg Pro 340	cag Gln	gcc Ala	tcg Ser	cgt Arg	gaa Glu 345	acc Thr	ctg Leu	gat Asp	cat His	tcc Ser 350	atc Ile	atg Met	1056
tac Tyr	att Ile	ttc Phe 355	gcc Ala	gtc Val	gcg Ala	ctt Leu	caa Gln 360	gat Asp	ggc Gly	gtg Val	tgg Trp	cac His 365	cac His	gag Glu	ttt Phe	1104
tcc Ser	tac Tyr 370	acc Thr	cgc Arg	aag Lys	cgt Arg	tcc Ser 375	acc Thr	cgc Arg	ccg Pro	gaa Glu	act Thr 380	gtg Val	gag Glu	ctg Leu	tgg Trp	1152
cac His 385	aag Lys	att Ile	cgc Arg	acc Thr	gtg Val 390	gag Glu	gat Asp	cct Pro	gaa Glu 395	tgg Trp	acg Thr	cgc Arg	cga Arg	tac Tyr	cat His 400	1200
tct Ser	gat Asp	gat Asp	cct Pro	gca Ala 405	aaa Lys	aag Lys	gcc Ala	ttt Phe	ggt Gly 410	gcg Ala	aaa Lys	gca Ala	gtg Val	atc Ile 415	aca Thr	1248
atg Met	gct Ala	gat Asp	ggc Gly 420	acc Thr	gtg Val	att Ile	gag Glu	gat Asp 425	gaa Glu	ttg Leu	gct Ala	gtc Val	gcg Ala 430	gat Asp	gcc Ala	1296

cac	ccg	ctg	ggt	gct	cgg	ccg	ttt	gcg	cgg	gag	aat	tac	att	gaa	aaa	1344
His	Pro	Leu	Gly	Ala	Arg	Pro	Phe	Ala	Arg	Glu	Asn	Tyr	Ile	Glu	Lys	
		435					440					445				
ttc	cgc	aca	ctc	gcg	cag	ggg	att	gtc	att	gat	tca	gaa	cag	gaa	cgc	1392
Phe	Arg	Thr	Leu	Ala	Gln	Gly	Ile	Val	Ile	Asp	Ser	Glu	Gln	Glu	Arg	
	450					455					460					
ttc	ttg	cat	gcc	gtg	caa	agc	ctg	cct	gac	ctg	gat	gat	ctt	gat	cag	1440
Phe	Leu	His	Ala	Val	Gln	Ser	Leu	Pro	Asp	Leu	Asp	Asp	Leu	Asp	Gln	
	465				470					475					480	
ctc	aac	atc	gaa	gtc	gac	ata	agc	aac	cag	gcc	gcg	acg	aaa	gcg	ggg	1488
Leu	Asn	Ile	Glu	Val	Asp	Ile	Ser	Asn	Gln	Ala	Ala	Thr	Lys	Ala	Gly	
				485					490					495		
ctg	tta	tga														1497
Leu	Leu															

<210> 6

<211> 498

<212> PRT

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 6

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

165 170 175
 Gly Leu Gly Thr Leu Leu His Val Asp Glu Glu Thr Ile Tyr Gln Ala
 180 185 190
 Ile Gly Gln Ala Leu His Thr Thr Thr Ala Thr Arg Gln Ser Arg Lys
 195 200 205
 Gly Glu Ile Ser Ser Trp Lys Ala Phe Ala Pro Ala Phe Ala Gly Lys
 210 215 220
 Met Ala Ile Glu Ala Met Asp Arg Ala Met Arg Gly Glu Gly Ser Pro
 225 230 235 240
 Ala Pro Ile Trp Glu Gly Glu Asp Gly Val Ile Ala Trp Leu Leu Ser
 245 250 255
 Gly Lys Asp His Val Tyr His Val Pro Leu Pro Glu His Gly Glu Leu
 260 265 270
 Lys Leu Gly Ile Leu Glu Thr Tyr Thr Lys Glu His Ser Ala Glu Tyr
 275 280 285
 Gln Ser Gln Ala Pro Ile Asp Leu Ala Arg Arg Met Lys Pro Leu Val
 290 295 300
 Asp Ala Ala Gly Gly Thr Glu His Ile Ala Glu Ile Val Leu Arg Thr
 305 310 315 320
 Ser His His Thr His Tyr Val Ile Gly Thr Gly Ala Asn Asp Pro Gln
 325 330 335
 Lys Met Asp Pro Gln Ala Ser Arg Glu Thr Leu Asp His Ser Ile Met
 340 345 350
 Tyr Ile Phe Ala Val Ala Leu Gln Asp Gly Val Trp His His Glu Phe
 355 360 365
 Ser Tyr Thr Arg Lys Arg Ser Thr Arg Pro Glu Thr Val Glu Leu Trp
 370 375 380
 His Lys Ile Arg Thr Val Glu Asp Pro Glu Trp Thr Arg Arg Tyr His
 385 390 395 400
 Ser Asp Asp Pro Ala Lys Lys Ala Phe Gly Ala Lys Ala Val Ile Thr
 405 410 415
 Met Ala Asp Gly Thr Val Ile Glu Asp Glu Leu Ala Val Ala Asp Ala
 420 425 430
 His Pro Leu Gly Ala Arg Pro Phe Ala Arg Glu Asn Tyr Ile Glu Lys
 435 440 445

Phe Arg Thr Leu Ala Gln Gly Ile Val Ile Asp Ser Glu Gln Glu Arg
450 455 460

Phe Leu His Ala Val Gln Ser Leu Pro Asp Leu Asp Asp Leu Asp Gln
465 470 475 480

Leu Asn Ile Glu Val Asp Ile Ser Asn Gln Ala Ala Thr Lys Ala Gly
485 490 495

Leu Leu

<210> 7

<211> 3000

5 <212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> característica variada

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

<223> secuencia situada corriente arriba de la CDS

<220>

<221> fijación del cebador

15 <222> (661)..(680)

<223> sitio de fijación del cebador prpD1_XL_A1

<220>

<221> CDS

20 <222> (751)..(2244)

<223> alelo de prpD1

<220>

<221> mutación

25 <222> (1565)..(1565)

<223> transición C -> T

<220>

<221> característica variada

30 <222> (2245)..(3000)

<223> secuencia situada corriente arriba de la CDS

<220>

<221> fijación del cebador

35 <222> (2258)..(2277)

<223> sitio de fijación del cebador prpD1_XL_E1

<400> 7

ggttccacct tcgccataac gcttgacgac gcctccctcc ttcactctcg gcgcatcatt 60

ttggcccacg gcgccgttga cgatctgccag gaggtagaag gactgtcaga tttttgggga 120

accaaagtgt tgcaactgagc ttactgccac ggctttgagg cccgcgattc tgaaatcgtc 180

gtggtgggta cctcgcccat ggctgcgcac caagcgttga tgttctcgca gttgtccaaa 240

actgtcagct ttggtgggcac gatcgacatt gatgaacaaa ccagcgagag cctagatagt 300

gctggagtaa aagtgttggg caccaatgag gtgcgcgtat ccgccgaagg tgatggcctg 360

tctgtggaac tgtccgaagg cgatcattta agctgcgaca acatcgtggt ggcattctcg 420

ccactggtgg atggcacgct gtacacccaa cttggtggtc agatggaaga aaacccgatg	480
ggcaggttca ttccaggtac ccaaaccggg cgcactccta ttgaaggtgt gtgggctgcc	540
ggaaacgcgc aagctcccat ggcatggtc tatggttccg ctgctcaagg cgtgatggct	600
ggagcagaga tcaactttga tctgatcctg gaagatattt ccgtggcaag cgcgcagagc	660
taaactgcgt gaggttgtgg cctgtcacac ataatcggcc taggggtggga ctttaaggaa	720
acagtgcaca aataaatctc aaggagcccc atg cgc atc cac gat gtt tat acc	774
Met Arg Ile His Asp Val Tyr Thr	
1 5	
cac ctt tcg gcc gat aac ttt ccc aaa gca gag cac ctt gcg tgg aaa	822
His Leu Ser Ala Asp Asn Phe Pro Lys Ala Glu His Leu Ala Trp Lys	
10 15 20	
ttc tcc gag ctt gcc acc gac ccc gtg gag gtg aca ccg gat gtt tcg	870
Phe Ser Glu Leu Ala Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Pro Asp Val Ser	
25 30 35 40	
gag atg atc atc aac cgg atc atc gac aac gcg gcg gtg tct gcc gcg	918
Glu Met Ile Ile Asn Arg Ile Ile Asp Asn Ala Ala Val Ser Ala Ala	
45 50 55	
tcg gtg ttg cgc cgg cct gtg act gtg gcc agg caa caa gcg cag tcc	966
Ser Val Leu Arg Arg Pro Val Thr Val Ala Arg Gln Gln Ala Gln Ser	
60 65 70	
cat ccg cgg gaa aag ggc gga aaa gtt ttt gga att tca ggc agc tac	1014
His Pro Arg Glu Lys Gly Gly Lys Val Phe Gly Ile Ser Gly Ser Tyr	
75 80 85	
tca cca gag tgg gct gcc ttt gct aat ggt gtg gcc gta cgt gaa ttg	1062
Ser Pro Glu Trp Ala Ala Phe Ala Asn Gly Val Ala Val Arg Glu Leu	
90 95 100	
gac ttc cac gat aca ttt tta gca gct gaa tac tcc cat ccc ggc gac	1110
Asp Phe His Asp Thr Phe Leu Ala Ala Glu Tyr Ser His Pro Gly Asp	
105 110 115 120	
aat att cca cca ctt ctt gca gta gcg cag gct cag aga agc agc ggc	1158
Asn Ile Pro Pro Leu Leu Ala Val Ala Gln Ala Gln Arg Ser Ser Gly	
125 130 135	
agg gat ctc att cgg ggt atc gcc act gcc tat gag gtg cag gtg gaa	1206
Arg Asp Leu Ile Arg Gly Ile Ala Thr Ala Tyr Glu Val Gln Val Glu	
140 145 150	
ttg gtg agg ggg atc tgc ttg cat gag cac aaa att gat cac gta gcc	1254
Leu Val Arg Gly Ile Cys Leu His Glu His Lys Ile Asp His Val Ala	
155 160 165	
cac ctt ggt ccc agc gct gca gcg ggt ttg ggc acg ttg ttg cat gta	1302
His Leu Gly Pro Ser Ala Ala Ala Gly Leu Gly Thr Leu Leu His Val	
170 175 180	
gat gag gaa acc atc tac cag gcg atc ggc cag gca ttg cac acc acg	1350
Asp Glu Glu Thr Ile Tyr Gln Ala Ile Gly Gln Ala Leu His Thr Thr	
185 190 195 200	
acg gct acg agg cag tcg cga aaa ggt gag att tcc agc tgg aag gcg	1398
Thr Ala Thr Arg Gln Ser Arg Lys Gly Glu Ile Ser Ser Trp Lys Ala	
205 210 215	
ttc gcg cca gcg ttt gcg gga aag atg gcc att gag gcg atg gat cgt	1446
Phe Ala Pro Ala Phe Ala Gly Lys Met Ala Ile Glu Ala Met Asp Arg	
220 225 230	

gcg atg cgt ggg gag ggt tgc ccc gca ccg att tgg gag ggc gaa gac Ala Met Arg Gly Glu Gly Ser Pro Ala Pro Ile Trp Glu Gly Glu Asp 235 240 245	1494
ggg gtc atc gcg tgg ctg tta tgc ggc aaa gat cat gtt tat cat gtg Gly Val Ile Ala Trp Leu Leu Ser Gly Lys Asp His Val Tyr His Val 250 255 260	1542
cca ttg ccg gaa cac ggc gag ctc aag ctg ggg att cta gag act tac Pro Leu Pro Glu His Gly Glu Leu Lys Leu Gly Ile Leu Glu Thr Tyr 265 270 275 280	1590
aca aag gaa cat tca gcg gaa tat caa tgc cag gca ccg att gat ctg Thr Lys Glu His Ser Ala Glu Tyr Gln Ser Gln Ala Pro Ile Asp Leu 285 290 295	1638
gcg cgc agg atg aag cca ctg gtt gac gcg gct ggc gga acg gaa cac Ala Arg Arg Met Lys Pro Leu Val Asp Ala Ala Gly Gly Thr Glu His 300 305 310	1686
att gca gag att gtg ctg cgc acc agt cac cac acg cat tat gtg att Ile Ala Glu Ile Val Leu Arg Thr Ser His His Thr His Tyr Val Ile 315 320 325	1734
ggc act ggg gcg aac gat ccg cag aag atg gat ccg cag gcc tcg cgt Gly Thr Gly Ala Asn Asp Pro Gln Lys Met Asp Pro Gln Ala Ser Arg 330 335 340	1782
gaa acc ctg gat cat tcc atc atg tac att ttc gcc gtc gcg ctt caa Glu Thr Leu Asp His Ser Ile Met Tyr Ile Phe Ala Val Ala Leu Gln 345 350 355 360	1830
gat ggc gtg tgg cac cac gag ttt tcc tac acc cgc aag cgt tcc acc Asp Gly Val Trp His His Glu Phe Ser Tyr Thr Arg Lys Arg Ser Thr 365 370 375	1878
cgc ccg gaa act gtg gag ctg tgg cac aag att cgc acc gtg gag gat Arg Pro Glu Thr Val Glu Leu Trp His Lys Ile Arg Thr Val Glu Asp 380 385 390	1926
cct gaa tgg acg cgc cga tac cat tct gat gat cct gca aaa aag gcc Pro Glu Trp Thr Arg Arg Tyr His Ser Asp Asp Pro Ala Lys Lys Ala 395 400 405	1974
ttt ggt gcg aaa gca gtg atc aca atg gct gat ggc acc gtg att gag Phe Gly Ala Lys Ala Val Ile Thr Met Ala Asp Gly Thr Val Ile Glu 410 415 420	2022
gat gaa ttg gct gtc gcg gat gcc cac ccg ctg ggt gct cgg ccg ttt Asp Glu Leu Ala Val Ala Asp Ala His Pro Leu Gly Ala Arg Pro Phe 425 430 435 440	2070
gcg cgg gag aat tac att gaa aaa ttc cgc aca ctc gcg cag ggg att Ala Arg Glu Asn Tyr Ile Glu Lys Phe Arg Thr Leu Ala Gln Gly Ile 445 450 455	2118
gtc att gat tca gaa cag gaa cgc ttc ttg cat gcc gtg caa agc ctg Val Ile Asp Ser Glu Gln Glu Arg Phe Leu His Ala Val Gln Ser Leu 460 465 470	2166
cct gac ctg gat gat ctt gat cag ctc aac atc gaa gtc gac ata agc Pro Asp Leu Asp Asp Leu Asp Gln Leu Asn Ile Glu Val Asp Ile Ser 475 480 485	2214
aac cag gcc gcg acg aaa gcg ggg ctg tta tgaatctctt ttcgaatggt Asn Gln Ala Ala Thr Lys Ala Gly Leu Leu 490 495	2264

gttgatgtgg ggaggcgtcg acaagcattt aaagcggcac tcgccgcacc ccacatcgcc 2324
 cggctgcccc ggcgattctc ccctctgatt ggcgcgtcca tcgaagaagc cggcttcgaa 2384
 ggcgctctacg ttcccggcgc cgtcatagct gctgacctgg cactacccga tatcggcttg 2444
 acgacgctga ccgaagtcgc ccaccgcgcg cggcaaattg cgcgcgtcac agacctagga 2504
 gtgcttgctg acgccgacac cggctttggc gaacccatgt cggccgcacg caccgtcgcc 2564
 gaattggagg acgccggtgt ggccggatgc caccttgaag accaagtcaa ccccaaacgt 2624
 tgcggggcact tggacggcaa agaagtcgtg cgcacagacg tgatggttcg acgcatcgca 2684
 gccgccgtct cggcccggcg cgaccgaac tttgtcatct gcgccgcac cgacgccgct 2744
 ggagtggaa gaaatcgacgc cgccattgag cgcgcgaaag cctacttaga tgcgggcgcc 2804
 gacatgattt tcaccgaagc cctccacagc gaagccgact tccgatactt ccggcacgcc 2864
 atccctgatg ccttgttgct ggcgaatatg accgaatttg gcaaaacgac gctgctgtca 2924
 gccgacgtgt tggagagat tggctacaac gccgtgatct accccgtgac cacgctgcgt 2984
 attgccatgg gacaag 3000

<210> 8

<211> 498

<212> PRT

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 8

Met Arg Ile His Asp Val Tyr Thr His Leu Ser Ala Asp Asn Phe Pro
 1 5 10 15

Lys Ala Glu His Leu Ala Trp Lys Phe Ser Glu Leu Ala Thr Asp Pro
 20 25 30

Val Glu Val Thr Pro Asp Val Ser Glu Met Ile Ile Asn Arg Ile Ile
 35 40 45

Asp Asn Ala Ala Val Ser Ala Ala Ser Val Leu Arg Arg Pro Val Thr
 50 55 60

Val Ala Arg Gln Gln Ala Gln Ser His Pro Arg Glu Lys Gly Gly Lys
 65 70 75 80

Val Phe Gly Ile Ser Gly Ser Tyr Ser Pro Glu Trp Ala Ala Phe Ala
 85 90 95

Asn Gly Val Ala Val Arg Glu Leu Asp Phe His Asp Thr Phe Leu Ala
 100 105 110

Ala Glu Tyr Ser His Pro Gly Asp Asn Ile Pro Pro Leu Leu Ala Val
 115 120 125

Ala Gln Ala Gln Arg Ser Ser Gly Arg Asp Leu Ile Arg Gly Ile Ala
 130 135 140

Thr Ala Tyr Glu Val Gln Val Glu Leu Val Arg Gly Ile Cys Leu His
 145 150 155 160
 Glu His Lys Ile Asp His Val Ala His Leu Gly Pro Ser Ala Ala Ala
 165 170 175
 Gly Leu Gly Thr Leu Leu His Val Asp Glu Glu Thr Ile Tyr Gln Ala
 180 185 190
 Ile Gly Gln Ala Leu His Thr Thr Thr Ala Thr Arg Gln Ser Arg Lys
 195 200 205
 Gly Glu Ile Ser Ser Trp Lys Ala Phe Ala Pro Ala Phe Ala Gly Lys
 210 215 220
 Met Ala Ile Glu Ala Met Asp Arg Ala Met Arg Gly Glu Gly Ser Pro
 225 230 235 240
 Ala Pro Ile Trp Glu Gly Glu Asp Gly Val Ile Ala Trp Leu Leu Ser
 245 250 255
 Gly Lys Asp His Val Tyr His Val Pro Leu Pro Glu His Gly Glu Leu
 260 265 270
 Lys Leu Gly Ile Leu Glu Thr Tyr Thr Lys Glu His Ser Ala Glu Tyr
 275 280 285
 Gln Ser Gln Ala Pro Ile Asp Leu Ala Arg Arg Met Lys Pro Leu Val
 290 295 300
 Asp Ala Ala Gly Gly Thr Glu His Ile Ala Glu Ile Val Leu Arg Thr
 305 310 315 320
 Ser His His Thr His Tyr Val Ile Gly Thr Gly Ala Asn Asp Pro Gln
 325 330 335
 Lys Met Asp Pro Gln Ala Ser Arg Glu Thr Leu Asp His Ser Ile Met
 340 345 350
 Tyr Ile Phe Ala Val Ala Leu Gln Asp Gly Val Trp His His Glu Phe
 355 360 365
 Ser Tyr Thr Arg Lys Arg Ser Thr Arg Pro Glu Thr Val Glu Leu Trp
 370 375 380
 His Lys Ile Arg Thr Val Glu Asp Pro Glu Trp Thr Arg Arg Tyr His
 385 390 395 400
 Ser Asp Asp Pro Ala Lys Lys Ala Phe Gly Ala Lys Ala Val Ile Thr
 405 410 415

Met Ala Asp Gly Thr Val Ile Glu Asp Glu Leu Ala Val Ala Asp Ala
420 425 430

His Pro Leu Gly Ala Arg Pro Phe Ala Arg Glu Asn Tyr Ile Glu Lys
435 440 445

Phe Arg Thr Leu Ala Gln Gly Ile Val Ile Asp Ser Glu Gln Glu Arg
450 455 460

Phe Leu His Ala Val Gln Ser Leu Pro Asp Leu Asp Asp Leu Asp Gln
465 470 475 480

Leu Asn Ile Glu Val Asp Ile Ser Asn Gln Ala Ala Thr Lys Ala Gly
485 490 495

Leu Leu

<210> 9

<211> 28

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador prpD1_XL-A1

10 <220>

<221> característica variada

<222> (1)..(2)

<220>

15 <221> característica variada

<222> (3)..(8)

<223> sitio de corte por restricción con EcoRI

<400> 9

20 gcgaattcta aactgctga ggtgtgg

<210> 10

<211> 28

<212> ADN

25 <213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador prpD1_XL_E1

30 <220>

<221> característica variada

<222> (1)..(2)

<220>

35 <221> característica variada

<222> (3)..(8)

<223> sitio de corte por restricción con EcoRI

40 <400> 10

gcgaattctc cccacatcaa caccattc

<210> 11

<211> 1263
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

5 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (1263)
 <223> gen lysC de tipo silvestre

10 <400> 11

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

225		230		235		240	
att gcc ggc tct atg gag gat att cct gtg gaa gaa gca gtc ctt acc							768
Ile Ala Gly Ser Met	Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr	245	250	255			
ggg gtc gca acc gac aag tcc gaa gcc aaa gta acc gtt ctg ggt att							816
Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile	260	265	270				
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							1263
Ala Gly Thr Gly Arg	420						

<210> 12

<211> 421

<212> PRT

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 12

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

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

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

Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg
 50 55 60
 Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu
 65 70 75 80
 Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr
 85 90 95
 Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg
 100 105 110
 Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly
 115 120 125
 Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg
 130 135 140
 Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala
 145 150 155 160
 Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val
 165 170 175
 Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys
 180 185 190
 Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly
 195 200 205
 Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn
 210 215 220
 Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu
 225 230 235 240
 Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr
 245 250 255
 Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile
 260 265 270
 Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp
 275 280 285
 Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu
 290 295 300
 Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg
 305 310 315 320

Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr
325 330 335
Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala
340 345 350
Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu
355 360 365
Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg
370 375 380
Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala
385 390 395 400
Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr
405 410 415
Ala Gly Thr Gly Arg
420

<210> 13

<211> 1633

<212> ADN

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> característica variada

<222> (1)..(2)

10

<220>

<221> característica variada

<222> (1)..(1633)

<223> producto de la PCR

15

<220>

<221> estructura variada

<222> (3)..(8)

<223> sitio de corte por restricción con EcoRI

20

<220>

<221> CDS

<222> (99)..(1592)

25

<220>

<221> mutación

<222> (913)..(913)

<223> transición C -> T

30

<220>

<221> estructura variada

<222> (1626)..(1631)

<223> sitio de corte por restricción con EcoRI

35

<220>

<221> característica variada

<222> (1632)..(1633)

<400> 13

gcgaattcta aactgcgtga gggtgtggcc tgtcacacat aatcggccta gggtgggact ttaaggaaac agtgcacaaa taaatctcaa ggagcccc atg cgc atc cac gat gtt Met Arg Ile His Asp Val 1 5	60 116
tat acc cac ctt tcg gcc gat aac ttt ccc aaa gca gag cac ctt gcg Tyr Thr His Leu Ser Ala Asp Asn Phe Pro Lys Ala Glu His Leu Ala 10 15 20	164
tgg aaa ttc tcc gag ctt gcc acc gac ccc gtg gag gtg aca ccg gat Trp Lys Phe Ser Glu Leu Ala Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Pro Asp 25 30 35	212
gtt tcg gag atg atc atc aac cgg atc atc gac aac gcg gcg gtg tct Val Ser Glu Met Ile Ile Asn Arg Ile Ile Asp Asn Ala Ala Val Ser 40 45 50	260
gcc gcg tcg gtg ttg cgc cgg cct gtg act gtg gcc agg caa caa gcg Ala Ala Ser Val Leu Arg Arg Pro Val Thr Val Ala Arg Gln Gln Ala 55 60 65 70	308
cag tcc cat ccg cgg gaa aag ggc gga aaa gtt ttt gga att tca ggc Gln Ser His Pro Arg Glu Lys Gly Gly Lys Val Phe Gly Ile Ser Gly 75 80 85	356
agc tac tca cca gag tgg gct gcc ttt gct aat ggt gtg gcc gta cgt Ser Tyr Ser Pro Glu Trp Ala Ala Phe Ala Asn Gly Val Ala Val Arg 90 95 100	404
gaa ttg gac ttc cac gat aca ttt tta gca gct gaa tac tcc cat ccc Glu Leu Asp Phe His Asp Thr Phe Leu Ala Ala Glu Tyr Ser His Pro 105 110 115	452
ggc gac aat att cca cca ctt ctt gca gta gcg cag gct cag aga agc Gly Asp Asn Ile Pro Pro Leu Leu Ala Val Ala Gln Ala Gln Arg Ser 120 125 130	500
agc ggc agg gat ctc att cgg ggt atc gcc act gcc tat gag gtg cag Ser Gly Arg Asp Leu Ile Arg Gly Ile Ala Thr Ala Tyr Glu Val Gln 135 140 145 150	548
gtg gaa ttg gtg agg ggg atc tgc ttg cat gag cac aaa att gat cac Val Glu Leu Val Arg Gly Ile Cys Leu His Glu His Lys Ile Asp His 155 160 165	596
gta gcc cac ctt ggt ccc agc gct gca gcg ggt ttg ggc acg ttg ttg Val Ala His Leu Gly Pro Ser Ala Ala Ala Gly Leu Gly Thr Leu Leu 170 175 180	644
cat gta gat gag gaa acc atc tac cag gcg atc ggc cag gca ttg cac His Val Asp Glu Glu Thr Ile Tyr Gln Ala Ile Gly Gln Ala Leu His 185 190 195	692
acc acg acg gct acg agg cag tcg cga aaa ggt gag att tcc agc tgg Thr Thr Thr Ala Thr Arg Gln Ser Arg Lys Gly Glu Ile Ser Ser Trp 200 205 210	740
aag gcg ttc gcg cca gcg ttt gcg gga aag atg gcc att gag gcg atg Lys Ala Phe Ala Pro Ala Phe Ala Gly Lys Met Ala Ile Glu Ala Met 215 220 225 230	788
gat cgt gcg atg cgt ggg gag ggt tcg ccc gca ccg att tgg gag ggc Asp Arg Ala Met Arg Gly Glu Gly Ser Pro Ala Pro Ile Trp Glu Gly 235 240 245	836
gaa gac ggg gtc atc gcg tgg ctg tta tcg ggc aaa gat cat gtt tat Glu Asp Gly Val Ile Ala Trp Leu Leu Ser Gly Lys Asp His Val Tyr 250 255 260	884
cat gtg cca ttg ccg gaa cac ggc gag ctc aag ctg ggg att cta gag	932

His Val Pro Leu Pro Glu His Gly Glu Leu Lys Leu Gly Ile Leu Glu	
265 270 275	
act tac aca aag gaa cat tca gcg gaa tat caa tcg cag gca ccg att	980
Thr Tyr Thr Lys Glu His Ser Ala Glu Tyr Gln Ser Gln Ala Pro Ile	
280 285 290	
gat ctg gcg cgc agg atg aag cca ctg gtt gac gcg gct ggc gga acg	1028
Asp Leu Ala Arg Arg Met Lys Pro Leu Val Asp Ala Ala Gly Gly Thr	
295 300 305 310	
gaa cac att gca gag att gtg ctg cgc acc agt cac cac acg cat tat	1076
Glu His Ile Ala Glu Ile Val Leu Arg Thr Ser His His Thr His Tyr	
315 320 325	
gtg att ggc act ggg gcg aac gat ccg cag aag atg gat ccg cag gcc	1124
Val Ile Gly Thr Gly Ala Asn Asp Pro Gln Lys Met Asp Pro Gln Ala	
330 335 340	
tcg cgt gaa acc ctg gat cat tcc atc atg tac att ttc gcc gtc gcg	1172
Ser Arg Glu Thr Leu Asp His Ser Ile Met Tyr Ile Phe Ala Val Ala	
345 350 355	
ctt caa gat ggc gtg tgg cac cac gag ttt tcc tac acc cgc aag cgt	1220
Leu Gln Asp Gly Val Trp His His Glu Phe Ser Tyr Thr Arg Lys Arg	
360 365 370	
tcc acc cgc ccg gaa act gtg gag ctg tgg cac aag att cgc acc gtg	1268
Ser Thr Arg Pro Glu Thr Val Glu Leu Trp His Lys Ile Arg Thr Val	
375 380 385 390	
gag gat cct gaa tgg acg cgc cga tac cat tct gat gat cct gca aaa	1316
Glu Asp Pro Glu Trp Thr Arg Arg Tyr His Ser Asp Asp Pro Ala Lys	
395 400 405	
aag gcc ttt ggt gcg aaa gca gtg atc aca atg gct gat ggc acc gtg	1364
Lys Ala Phe Gly Ala Lys Ala Val Ile Thr Met Ala Asp Gly Thr Val	
410 415 420	
att gag gat gaa ttg gct gtc gcg gat gcc cac ccg ctg ggt gct cgg	1412
Ile Glu Asp Glu Leu Ala Val Ala Asp Ala His Pro Leu Gly Ala Arg	
425 430 435	
ccg ttt gcg cgg gag aat tac att gaa aaa ttc cgc aca ctc gcg cag	1460
Pro Phe Ala Arg Glu Asn Tyr Ile Glu Lys Phe Arg Thr Leu Ala Gln	
440 445 450	
ggg att gtc att gat tca gaa cag gaa cgc ttc ttg cat gcc gtg caa	1508
Gly Ile Val Ile Asp Ser Glu Gln Glu Arg Phe Leu His Ala Val Gln	
455 460 465 470	
agc ctg cct gac ctg gat gat ctt gat cag ctc aac atc gaa gtc gac	1556
Ser Leu Pro Asp Leu Asp Asp Leu Asp Gln Leu Asn Ile Glu Val Asp	
475 480 485	
ata agc aac cag gcc gcg acg aaa gcg ggg ctg tta tgaatctctt	1602
Ile Ser Asn Gln Ala Ala Thr Lys Ala Gly Leu Leu	
490 495	
ttcgaatggg gttgatgtgg ggagaattcg c	1633

<210> 14

<211> 498

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 14

Met Arg Ile His Asp Val Tyr Thr His Leu Ser Ala Asp Asn Phe Pro
 1 5 10 15
 Lys Ala Glu His Leu Ala Trp Lys Phe Ser Glu Leu Ala Thr Asp Pro
 20 25 30
 Val Glu Val Thr Pro Asp Val Ser Glu Met Ile Ile Asn Arg Ile Ile
 35 40 45
 Asp Asn Ala Ala Val Ser Ala Ala Ser Val Leu Arg Arg Pro Val Thr
 50 55 60
 Val Ala Arg Gln Gln Ala Gln Ser His Pro Arg Glu Lys Gly Gly Lys
 65 70 75 80
 Val Phe Gly Ile Ser Gly Ser Tyr Ser Pro Glu Trp Ala Ala Phe Ala
 85 90 95
 Asn Gly Val Ala Val Arg Glu Leu Asp Phe His Asp Thr Phe Leu Ala
 100 105 110
 Ala Glu Tyr Ser His Pro Gly Asp Asn Ile Pro Pro Leu Leu Ala Val
 115 120 125
 Ala Gln Ala Gln Arg Ser Ser Gly Arg Asp Leu Ile Arg Gly Ile Ala
 130 135 140
 Thr Ala Tyr Glu Val Gln Val Glu Leu Val Arg Gly Ile Cys Leu His
 145 150 155 160
 Glu His Lys Ile Asp His Val Ala His Leu Gly Pro Ser Ala Ala Ala
 165 170 175
 Gly Leu Gly Thr Leu Leu His Val Asp Glu Glu Thr Ile Tyr Gln Ala
 180 185 190
 Ile Gly Gln Ala Leu His Thr Thr Thr Ala Thr Arg Gln Ser Arg Lys
 195 200 205
 Gly Glu Ile Ser Ser Trp Lys Ala Phe Ala Pro Ala Phe Ala Gly Lys
 210 215 220
 Met Ala Ile Glu Ala Met Asp Arg Ala Met Arg Gly Glu Gly Ser Pro
 225 230 235 240
 Ala Pro Ile Trp Glu Gly Glu Asp Gly Val Ile Ala Trp Leu Leu Ser
 245 250 255
 Gly Lys Asp His Val Tyr His Val Pro Leu Pro Glu His Gly Glu Leu
 260 265 270
 Lys Leu Gly Ile Leu Glu Thr Tyr Thr Lys Glu His Ser Ala Glu Tyr

275 280 285
 Gln Ser Gln Ala Pro Ile Asp Leu Ala Arg Arg Met Lys Pro Leu Val
 290 295 300
 Asp Ala Ala Gly Gly Thr Glu His Ile Ala Glu Ile Val Leu Arg Thr
 305 310 315 320
 Ser His His Thr His Tyr Val Ile Gly Thr Gly Ala Asn Asp Pro Gln
 325 330 335
 Lys Met Asp Pro Gln Ala Ser Arg Glu Thr Leu Asp His Ser Ile Met
 340 345 350
 Tyr Ile Phe Ala Val Ala Leu Gln Asp Gly Val Trp His His Glu Phe
 355 360 365
 Ser Tyr Thr Arg Lys Arg Ser Thr Arg Pro Glu Thr Val Glu Leu Trp
 370 375 380
 His Lys Ile Arg Thr Val Glu Asp Pro Glu Trp Thr Arg Arg Tyr His
 385 390 395 400
 Ser Asp Asp Pro Ala Lys Lys Ala Phe Gly Ala Lys Ala Val Ile Thr
 405 410 415
 Met Ala Asp Gly Thr Val Ile Glu Asp Glu Leu Ala Val Ala Asp Ala
 420 425 430
 His Pro Leu Gly Ala Arg Pro Phe Ala Arg Glu Asn Tyr Ile Glu Lys
 435 440 445
 Phe Arg Thr Leu Ala Gln Gly Ile Val Ile Asp Ser Glu Gln Glu Arg
 450 455 460
 Phe Leu His Ala Val Gln Ser Leu Pro Asp Leu Asp Asp Leu Asp Gln
 465 470 475 480
 Leu Asn Ile Glu Val Asp Ile Ser Asn Gln Ala Ala Thr Lys Ala Gly
 485 490 495

Leu Leu

<210> 15

<211> 1311

<212> ADN

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1308)

10 <223> gen iLvA de tipo silvestre

<400> 15

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

aac cag ggt cgc gtg cac atg atg agc gcg acc gag ggc gct gtg tgt	864
Asn Gln Gly Arg Val His Met Met Ser Ala Thr Glu Gly Ala Val Cys	
275 280 285	
act gag atg ctc gat ctt tac caa aac gaa ggc atc atc gcg gag cct	912
Thr Glu Met Leu Asp Leu Tyr Gln Asn Glu Gly Ile Ile Ala Glu Pro	
290 295 300	
gct ggc gcg ctg tct atc gct ggg ttg aag gaa atg tcc ttt gca cct	960
Ala Gly Ala Leu Ser Ile Ala Gly Leu Lys Glu Met Ser Phe Ala Pro	
305 310 315 320	
ggg tct gtc gtg gtg tgc atc atc tct ggt ggc aac aac gat gtg ctg	1008
Gly Ser Val Val Val Cys Ile Ile Ser Gly Gly Asn Asn Asp Val Leu	
325 330 335	
cgt tat gcg gaa atc gct gag cgc tcc ttg gtg cac cgc ggt ttg aag	1056
Arg Tyr Ala Glu Ile Ala Glu Arg Ser Leu Val His Arg Gly Leu Lys	
340 345 350	
cac tac ttc ttg gtg aac ttc ccg caa aag cct ggt cag ttg cgt cac	1104
His Tyr Phe Leu Val Asn Phe Pro Gln Lys Pro Gly Gln Leu Arg His	
355 360 365	
ttc ctg gaa gat atc ctg gga ccg gat gat gac atc acg ctg ttt gag	1152
Phe Leu Glu Asp Ile Leu Gly Pro Asp Asp Ile Thr Leu Phe Glu	
370 375 380	
tac ctc aag cgc aac aac cgt gag acc ggt act gcg ttg gtg ggt att	1200
Tyr Leu Lys Arg Asn Asn Arg Glu Thr Gly Thr Ala Leu Val Gly Ile	
385 390 395 400	
cac ttg agt gaa gca tca gga ttg gat tct ttg ctg gaa cgt atg gag	1248
His Leu Ser Glu Ala Ser Gly Leu Asp Ser Leu Leu Glu Arg Met Glu	
405 410 415	
gaa tcg gca att gat tcc cgt cgc ctc gag ccg ggc acc cct gag tac	1296
Glu Ser Ala Ile Asp Ser Arg Arg Leu Glu Pro Gly Thr Pro Glu Tyr	
420 425 430	
gaa tac ttg acc taa	1311
Glu Tyr Leu Thr	
435	

<210> 16

<211> 436

<212> PRT

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 16

Met Ser Glu Thr Tyr Val Ser Glu Lys Ser Pro Gly Val Met Ala Ser
1 5 10 15

Gly Ala Glu Leu Ile Arg Ala Ala Asp Ile Gln Thr Ala Gln Ala Arg
20 25 30

Ile Ser Ser Val Ile Ala Pro Thr Pro Leu Gln Tyr Cys Pro Arg Leu
35 40 45

Ser Glu Glu Thr Gly Ala Glu Ile Tyr Leu Lys Arg Glu Asp Leu Gln
50 55 60

Asp Val Arg Ser Tyr Lys Ile Arg Gly Ala Leu Asn Ser Gly Ala Gln
 65 70 75 80
 Leu Thr Gln Glu Gln Arg Asp Ala Gly Ile Val Ala Ala Ser Ala Gly
 85 90 95
 Asn His Ala Gln Gly Val Ala Tyr Val Cys Lys Ser Leu Gly Val Gln
 100 105 110
 Gly Arg Ile Tyr Val Pro Val Gln Thr Pro Lys Gln Lys Arg Asp Arg
 115 120 125
 Ile Met Val His Gly Gly Glu Phe Val Ser Leu Val Val Thr Gly Asn
 130 135 140
 Asn Phe Asp Glu Ala Ser Ala Ala Ala His Glu Asp Ala Glu Arg Thr
 145 150 155 160
 Gly Ala Thr Leu Ile Glu Pro Phe Asp Ala Arg Asn Thr Val Ile Gly
 165 170 175
 Gln Gly Thr Val Ala Ala Glu Ile Leu Ser Gln Leu Thr Ser Met Gly
 180 185 190
 Lys Ser Ala Asp His Val Met Val Pro Val Gly Gly Gly Gly Leu Leu
 195 200 205
 Ala Gly Val Val Ser Tyr Met Ala Asp Met Ala Pro Arg Thr Ala Ile
 210 215 220
 Val Gly Ile Glu Pro Ala Gly Ala Ala Ser Met Gln Ala Ala Leu His
 225 230 235 240
 Asn Gly Gly Pro Ile Thr Leu Glu Thr Val Asp Pro Phe Val Asp Gly
 245 250 255
 Ala Ala Val Lys Arg Val Gly Asp Leu Asn Tyr Thr Ile Val Glu Lys
 260 265 270
 Asn Gln Gly Arg Val His Met Met Ser Ala Thr Glu Gly Ala Val Cys
 275 280 285
 Thr Glu Met Leu Asp Leu Tyr Gln Asn Glu Gly Ile Ile Ala Glu Pro
 290 295 300
 Ala Gly Ala Leu Ser Ile Ala Gly Leu Lys Glu Met Ser Phe Ala Pro
 305 310 315 320
 Gly Ser Val Val Val Cys Ile Ile Ser Gly Gly Asn Asn Asp Val Leu
 325 330 335
 Arg Tyr Ala Glu Ile Ala Glu Arg Ser Leu Val His Arg Gly Leu Lys

340 345 350

His Tyr Phe Leu Val Asn Phe Pro Gln Lys Pro Gly Gln Leu Arg His
355 360 365

Phe Leu Glu Asp Ile Leu Gly Pro Asp Asp Asp Ile Thr Leu Phe Glu
370 375 380

Tyr Leu Lys Arg Asn Asn Arg Glu Thr Gly Thr Ala Leu Val Gly Ile
385 390 395 400

His Leu Ser Glu Ala Ser Gly Leu Asp Ser Leu Leu Glu Arg Met Glu
405 410 415

Glu Ser Ala Ile Asp Ser Arg Arg Leu Glu Pro Gly Thr Pro Glu Tyr
420 425 430

Glu Tyr Leu Thr
435

<210> 17

<211> 120

<212> ADN

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(120)

10 <223> parte de la región codificadora del alelo de prpD1

<220>

<221> característica variada

<222> (61)..(63)

15 <223> n e s a , c , g ó t

<400> 17

gcg tgg ctg tta tcg ggc aaa gat cat gtt tat cat gtg cca ttg ccg 48
Ala Trp Leu Leu Ser Gly Lys Asp His Val Tyr His Val Pro Leu Pro
1 5 10 15

gaa cac ggc gag nnn aag ctg ggg att cta gag act tac aca aag gaa 96
Glu His Gly Glu Xaa Lys Leu Gly Ile Leu Glu Thr Tyr Thr Lys Glu
20 25 30

cat tca gcg gaa tat caa tcg cag 120
His Ser Ala Glu Tyr Gln Ser Gln
35 40

<210> 18

20 <211> 40

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

25 <221> característica variada

<222> (21)..(21)

<223> El "Xaa" en la posición 21 representa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, val, Gln, His, Leu, Tyr, Trp, Cys o Phe.

30 <400> 18

Ala Trp Leu Leu Ser Gly Lys Asp His Val Tyr His Val Pro Leu Pro
1 5 10 15

Glu His Gly Glu Xaa Lys Leu Gly Ile Leu Glu Thr Tyr Thr Lys Glu
20 25 30

His Ser Ala Glu Tyr Gln Ser Gln
35 40

<210> 19

<211> 120

<212> ADN

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (120)

10 <223> una parte de la región codificadora del alelo de prpD1

<400> 19

gcg tgg ctg tta tcg ggc aaa gat cat gtt tat cat gtg cca ttg ccg 48
Ala Trp Leu Leu Ser Gly Lys Asp His Val Tyr His Val Pro Leu Pro
1 5 10 15

gaa cac ggc gag ctc aag ctg ggg att cta gag act tac aca aag gaa 96
Glu His Gly Glu Leu Lys Leu Gly Ile Leu Glu Thr Tyr Thr Lys Glu
20 25 30

cat tca gcg gaa tat caa tcg cag 120
His Ser Ala Glu Tyr Gln Ser Gln
35 40

<210> 20

<211> 40

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

15

<400> 20

Ala Trp Leu Leu Ser Gly Lys Asp His Val Tyr His Val Pro Leu Pro
1 5 10 15

Glu His Gly Glu Leu Lys Leu Gly Ile Leu Glu Thr Tyr Thr Lys Glu
20 25 30

His Ser Ala Glu Tyr Gln Ser Gln
35 40

20

REIVINDICACIONES

1. Mutantes aislados de bacterias corineformes, que contienen un gen, que codifica un polipéptido con una actividad de 2-metilcitrato deshidratasa, caracterizados por que el polipéptido contiene L-leucina en la posición correspondiente a la posición 272 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o por que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, estando contenida L-leucina en la posición 272.

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*, de manera preferida de *Corynebacterium glutamicum*.

3. Mutantes de bacterias corineformes de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, caracterizados por que se trata de unas bacterias que segregan L-aminoácidos, de manera preferida de unas bacterias que segregan L-lisina, L-valina, L-isoleucina, L-triptófano o L-homoserina.

4. Mutantes de bacterias corineformes de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 3, caracterizados por que el gen comprende una secuencia de nucleótidos, que es idéntica a la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido, que es obtenible mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediando utilización de un ADN que se ha obtenido a partir de una bacteria corineforme y mediando utilización 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 situada entre las posiciones 1 y 750 de la SEQ ID NO: 3 o de la SEQ ID NO: 7, y de un segundo cebador, que comprende por lo menos 15 nucleótidos consecutivos escogidos a partir de la secuencia de nucleótidos complementaria entre las posiciones 3.000 y 2.245 de la SEQ ID NO: 3 o de la SEQ ID NO: 7, o

por que el polipéptido codificado comprende una secuencia de aminoácidos con una longitud correspondiente a 498 L-aminoácidos, o

por que el polipéptido codificado desde la posición 252 hasta 291 de la secuencia de aminoácidos contiene la secuencia correspondiente a las posiciones 252 hasta 291 de la SEQ ID NO: 6, o

por que el polipéptido codificado comprende una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en por lo menos un 90 % a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 y que contiene L-leucina en la posición 272, o

por que el gen comprende una secuencia de nucleótidos, que es idéntica en por lo menos un 90 % a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5.

5. Mutantes de bacterias corineformes de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizados por que la proteína codificada comprende una secuencia de aminoácidos escogida entre el conjunto que se compone de

- a) una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 6,
- b) una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 6 inclusive como máximo 5 intercambios conservativos de aminoácidos, y
- c) una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 6 inclusive como máximo 5 inserciones o supresiones de aminoácidos.

6. Mutantes de bacterias corineformes de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizados por que el gen comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 o de la SEQ ID NO: 7.

7. Polinucleótido aislado, que codifica un polipéptido con una actividad enzimática de 2-metilcitrato deshidratasa, que contiene L-leucina en la posición correspondiente a la posición 272 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, estando contenida L-leucina en la posición 272.

8. Polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado por que el polipéptido codificado comprende una secuencia de aminoácidos con una longitud de 498 aminoácidos, o

5 por que el polipéptido codificado contiene, desde las posiciones 252 hasta 291 de la secuencia de aminoácidos, la secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 252 hasta 291 de la SEQ ID NO: 6, o

10 por que el polinucleótido aislado es idéntico a la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido, que es obtenible mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediando utilización de un ADN que se ha obtenido a partir de una bacteria corineforme y mediando utilización 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 situada entre las posiciones 1 y 750 de la SEQ ID NO: 3 o de la SEQ ID NO: 7, y de un segundo cebador, que comprende por lo menos 15 nucleótidos consecutivos escogidos a partir de la secuencia de nucleótidos complementaria entre las posiciones 3.000 y 2.245 de la SEQ ID NO: 3 o de la SEQ ID NO: 7, o

15 por que el polinucleótido aislado con una secuencia de nucleótidos complementaria a la SEQ ID NO: 5 se hibrida en condiciones rigurosas, o

20 por que el polipéptido codificado comprende una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en por lo menos un 90 % a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, o

por que el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos, que es idéntica en por lo menos un 90 % a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5, o

25 por que la proteína codificada comprende una secuencia de aminoácidos, escogida entre el conjunto que se compone de

a) una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 6,

30 b) una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 6, inclusive como máximo 5 intercambios conservativos de aminoácidos, y

c) una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 6, inclusive como máximo 5 inserciones o supresiones de aminoácidos.

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

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

45 11. 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 252 hasta 291 de la SEQ ID NO: 2, estando contenida L-leucina en la posición correspondiente a la posición 272 de la SEQ ID NO: 2.

12. Polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizado por que él codifica por lo menos un marco de lectura con una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 252 hasta 291 de la SEQ ID NO: 6, o

50 por que la secuencia de aminoácidos contiene uno o varios intercambios conservativos de aminoácidos, no concerniendo los intercambios conservativos de aminoácidos a la posición 272, o

por que el polinucleótido aislado contiene una o varias mutaciones mudas o,

55 el polinucleótido aislado comprende por lo menos la secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 1.504 hasta 1.623 de la SEQ ID NO: 7.

13. Un microorganismo recombinante, que contiene el polinucleótido aislado de acuerdo con las reivindicaciones 7 hasta 12.

60 14. Microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizado por que se trata de una bacteria corineforme o de una bacteria del género *Escherichia*, de manera preferida del género *Corynebacterium* y de manera especialmente preferida de la especie *Corynebacterium glutamicum*.

15. Un vector, que contiene el polinucleótido aislado de acuerdo con las reivindicaciones 7 hasta 12.

16. Un microorganismo recombinante, que contiene el vector de acuerdo con la reivindicación 15.

5 17. Microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 16,
caracterizado por que
se trata de una bacteria corineforme o de una bacteria del género *Escherichia*, de manera preferida
del género *Corynebacterium* y de manera especialmente preferida
10 de la especie *Corynebacterium glutamicum*.

18. Procedimiento para la producción de L-lisina
caracterizado por que

15 a) se fermenta una bacteria corineforme aislada en un medio adecuado, conteniendo la bacteria por lo menos
una copia de un gen, que codifica un polipéptido con una actividad enzimática de 2-metilcitrato
deshidratasa, conteniendo el polipéptido L-leucina en la posición correspondiente a la posición 272 de la
20 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2
o comprendiendo el polipéptido la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, en la que en la posición
272 está contenida L-leucina, y

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

25 19. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18,
caracterizado por que
en el caso de la bacteria corineforme aislada se trata de un mutante de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 6, o
se trata de una bacteria corineforme recombinante, que contiene un polinucleótido aislado de acuerdo con las
30 reivindicaciones 7 hasta 12 o que se había producido mediando utilización del mismo, o
por que se aísla o recoge el L-aminoácido, y de manera preferida
se purifica.

35 20. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18,
caracterizado por que
se aísla o recoge L-lisina en común con unos componentes del caldo de fermentación y/o de la biomasa (> 0 hasta
100 %), o

40 por que

a) a partir del caldo de fermentación obtenido a partir de la etapa b) de la reivindicación 18 se elimina la
biomasa formada en una proporción de 0 a 100 %, y

45 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.

50 21. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20,
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, o

por que a partir del caldo obtenido antes o después de la etapa a), se elimina agua, o

55 por que el producto conformado obtenido en o durante la etapa b) es rociado con un aceite.

22. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18,
caracterizado por que se llevan a cabo las siguientes etapas:

60 a) filtración del caldo de fermentación, de manera preferida con un filtro de membrana, de tal manera que se
obtenga un lodo que contiene una biomasa y un material filtrado,

65 b) aumento de la concentración del material filtrado, preferiblemente de tal manera que se obtenga un
contenido de materiales sólidos de 48 a 52 % en peso,

- c) granulación del material concentrado obtenido en la etapa b), de manera preferida a una temperatura de 50°C a 62°C, y
 - d) revestimiento del granulado obtenido en la etapa c) con uno o varios del/de los agente(s) de revestimiento (en inglés "coating agent(s)).
- 5

Figura 1: Plásmido pK18mbosacB_prpD1_P272L

