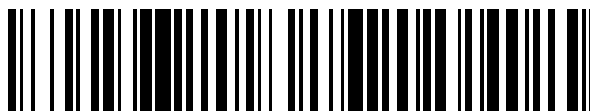


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 072**

51 Int. Cl.:

C12N 9/10 (2006.01)

C12P 13/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.04.2013** **PCT/EP2013/057660**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.10.2013** **WO13160124**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2013** **E 13718528 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018** **EP 2841568**

54 Título: **Alfa-isopropilmalato sintasas resistentes a la retroacción**

30 Prioridad:

27.04.2012 DE 102012207097

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

30.04.2018

73 Titular/es:

EVONIK TECHNOCHÉMIE GMBH (100.0%)

Gutenbergstrasse 2

69221 Dossenheim, DE

72 Inventor/es:

GERSTMEIR, ROBERT y

WIEGRÄBE, IRIS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 666 072 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

Alfa-isopropilmalato sintasas resistentes a la retroacción

- La invención se refiere a una secuencia nucleotídica aislada que codifica una secuencia de aminoácidos que es al menos $\geq 90\%$, $\geq 92\%$, $\geq 94\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$, $\geq 99\%$ o 100% , preferiblemente $\geq 97\%$, particularmente de forma preferible $\geq 98\%$, muy particularmente de forma preferible $\geq 99\%$, y extremadamente de forma preferible 100% , idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, en la que SEQ ID NO:2, en la posición 553, o en una posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos, tiene un aminoácido proteinogénico distinto de L-tirosina, a un microorganismo que comprende la secuencia nucleotídica, y también a un procedimiento para producir sustancias químicas finas usando este microorganismo.
- Las sustancias químicas finas, que incluyen en particular aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas, nucleósidos y nucleótidos, se usan en medicina humana, en la industria farmacéutica, en cosmética, en la industria alimentaria, y en la alimentación animal.
- Un gran número de estos compuestos se produce mediante fermentación de cepas de bacterias corineformes, en particular *Corynebacterium glutamicum*. Debido a su gran importancia, está en marcha constantemente el trabajo sobre la mejora del procedimiento de producción. Las mejoras del procedimiento se pueden referir a medidas de fermentación, tales como, por ejemplo, agitación y suministro con oxígeno, o la composición del medio nutriente, tal como, por ejemplo, la concentración de azúcar durante la fermentación, o el tratamiento para dar la forma de producto mediante, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, o las propiedades de comportamiento intrínsecas del propio microorganismo.
- Para mejorar las propiedades de comportamiento de dichos microorganismos, se emplean métodos de mutagénesis, cribado y selección de mutantes. De esta manera, se obtienen cepas que son resistentes a antimetabolitos tales como, por ejemplo, el análogo de leucina 4-azaleucina o 5,5,5-trifluoroleucina, y producen compuestos químicos, por ejemplo L-aminoácidos tales como L-leucina. A título de ejemplo, se puede hacer mención de la referencia bibliográfica Casalone et al. (Research in Microbiology 148: 613-623 1997).
- Igualmente, durante algunos años, se han usado métodos de tecnología de ADN recombinante para la mejora de cepas productoras de L-aminoácidos de *Corynebacterium glutamicum*, por cuanto, por ejemplo, se amplifican o atenúan los genes de la biosíntesis de aminoácidos individuales, o se estudia el efecto sobre la producción del compuesto químico.
- Las presentaciones que resumen la biología, la genética y la biotecnología de *Corynebacterium glutamicum* se pueden encontrar en el "Handbook of *Corynebacterium glutamicum*" (Eds.: L. Eggeling and M. Bott, CRC Press, Taylor & Francis, 2005), en la edición especial del Journal of Biotechnology (Editor Jefe: A. Pühler) con el título "A New Era in *Corynebacterium glutamicum* Biotechnology" (Journal of Biotechnology 104/1-3, (2003)), y en el libro de T. Scheper (Director Editorial) "Microbial Production of L-Amino Acids" (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 79, Springer Verlag, Berlín, Alemania, 2003).
- La secuencia nucleotídica del genoma de *Corynebacterium glutamicum* se describe en Ikeda y Nakagawa (Applied Microbiology and Biotechnology 62, 99-109 (2003)), en el documento EP 1 108 790, y en Kalinowski et al. (Journal of Biotechnology 104/1-3, (2003)).
- Las secuencias nucleotídicas del genoma de *Corynebacterium glutamicum* están igualmente disponibles en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) de la National Library of Medicine (Bethesda, Maryland, USA), en el DNA Data Bank of Japan (DDBJ, Mishima, Japón), o en la base de datos de secuencias nucleotídicas de los European Molecular Biology Laboratories (EMBL, Heidelberg, Alemania o Cambridge, UK).
- El gen *leuA* que codifica la α -isopropilmalato sintasa a partir de *Corynebacterium glutamicum* se describe, entre otros, por los siguientes detalles:
- La α -isopropilmalato sintasa (IPMS, EC=2.3.3.13) cataliza la condensación del grupo acetilo de acetil-CoA con 3-metil-2-oxobutanoato (2-oxoisovalerato, cetoisovalerato) para la formación de 3-carboxi-3-hidroxi-4-metilpentanoato (2-isopropilmalato). El gen *leuA* comprende 1851 pares de bases (pb) y codifica un polipéptido que tiene un M(r) de 68187. Como está generalizado para enzimas que catalizan la primera etapa de una ruta biosintética, la α -isopropilmalato sintasa está sujeta a regulación de retroacción por el producto final leucina (Patèk et al., Applied Environmental Microbiology 60:133-140 (1994)). Además, la enzima es inhibida por la coenzima A en presencia de cationes divalentes, especialmente cinc (Ulm et al., Journal of Bacteriology 110(3): 1118-1126 (1972); Tracy y Kohlhaw, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 72(5): 1802-1806 (1975)).
- La secuencia nucleotídica del gen *leuA* que codifica la α -isopropilmalato sintasa de *Corynebacterium glutamicum*, según los detalles de la NCBI Database, está representada en SEQ ID NO:1, y la secuencia de aminoácidos que resulta a partir de ella de la α -isopropilmalato sintasa modificada en SEQ ID NO: 4. En SEQ ID NO:3, se da a conocer adicionalmente las secuencias nucleotídicas situadas en dirección 5' y en dirección 3'.

En el documento EP 1067191 A2 se describe un método para producir L-leucina, en el que se cultiva una bacteria que se transforma con un ADN que codifica una α -isopropilmalato sintasa desensibilizada en la inhibición de retroacción por L-leucina, y que contribuye de ese modo a la productividad de L-leucina. En esta solicitud de patente se describen varias sustituciones de aminoácidos. Sin embargo, no se describe la mutación en la posición 553.

- 5 El objeto de la invención es proporcionar un procedimiento fermentativo para producir cetoisocaproato o L-leucina que tiene un rendimiento mejorado o una concentración final mayor del producto intracelularmente y/o en el medio.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar una célula que está modificada de tal manera que, incluso en presencia de concentraciones intracelulares elevadas de leucina, es capaz de producir cetoisocaproato o leucina.

- 10 Un objeto adicional de la invención es mejorar el rendimiento de cetoisocaproato o leucina, basado en la cantidad del sustrato de carbono usado para la fermentación.

Los inventores de la presente invención han establecido sorprendentemente que una mutación de la α -isopropilmalato sintasa conduce a un incremento en la producción de cetoisocaproato y leucina. Sin desear estar atados por cualquier teoría, los inventores sospechan que esta mutación disminuye o incluso elimina la inhibición de retroacción de la enzima, es decir, la reducción en la actividad enzimática mediada por la unión del producto a la enzima.

La expresión "leucina", que se usa de forma sinónima con "L-leucina", también incluyen sus sales, tales como, por ejemplo, hidrocloreto de L-leucina, sulfato de L-leucina, o la sal cálcica. Igualmente, la expresión cetoisocaproato (KIC) también comprende sus sales, tales como, por ejemplo, KIC cálcico, KIC potásico o KIC sódico.

- 20 La invención se refiere a una secuencia nucleotídica aislada que codifica una secuencia de aminoácidos que es al menos $\geq 90\%$, $\geq 92\%$, $\geq 94\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$, $\geq 99\%$ o 100% , preferiblemente $\geq 97\%$, particularmente de forma preferible $\geq 98\%$, muy particularmente de forma preferible $\geq 99\%$, y extremadamente de forma preferible 100% , idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, en la que SEQ ID NO:2, en la posición 553, o en una posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos, tiene un aminoácido proteinogénico distinto de L-tirosina, y en la que la secuencia nucleotídica es una secuencia nucleotídica replicable que codifica la enzima
- 25 isopropilmalato sintasa aislada de microorganismos del género *Corynebacterium*, en la que las secuencias proteicas codificadas de ese modo contienen un aminoácido proteinogénico distinto de L-tirosina en la posición correspondiente a la posición 553 de SEQ ID NO:2.

- 30 En una realización preferida, la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico según la invención tiene, en la posición 553 o en una posición correspondiente, un aminoácido que se selecciona del grupo que consiste en ácido glutámico, ácido aspártico, alanina, cisteína, serina, treonina, lisina, arginina, glutamina y asparagina, particularmente de forma preferible del grupo que consiste en ácido glutámico y ácido aspártico.

En una realización preferida, la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico según la invención tiene, en la posición 553 o en una posición correspondiente, ácido L-aspártico.

- 35 En una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico según la invención es una secuencia de ácido nucleico que tiene guanina en la posición 1657 o en una posición correspondiente, representada en SEQ ID NO:5.

- La expresión "una posición que corresponde a la posición 553 de la secuencia de aminoácidos" o "una posición comparable con la posición 553 de la secuencia de aminoácidos" se toman para significar el hecho de que, mediante inserción o supresión de un codón que codifica un aminoácido en la región N-terminal (basado en la posición 553 de SEQ ID NO:2) del polipéptido codificado, el enunciado posicional y el enunciado de longitud, en el caso de una
- 40 inserción, está formalmente incrementado en una unidad, o, en el caso de una supresión, disminuido en una unidad. De la misma manera, mediante inserción o supresión de un codón que codifica un aminoácido en la región C-terminal (basado en la posición 553) del polipéptido codificado, el enunciado de longitud, en el caso de una inserción, está formalmente incrementado en una unidad, o, en el caso de una supresión, disminuido en una unidad. Tales posiciones comparables se pueden identificar fácilmente mediante comparación de las secuencias de
- 45 aminoácidos en forma de un "alineamiento", por ejemplo usando el programa Clustal W (Thompson et al., Nucleic Acids Research 22, 4637-4680 (1994)) o el programa MAFFT (Katoh et al., Genome Information 2005; 16(1),22-33).

- Tales inserciones y supresiones no afectan sustancialmente a la actividad enzimática. "No afectan sustancialmente" significa que la actividad enzimática de dichas variantes difieren en un máximo de 10% , un máximo de $7,5\%$, un máximo de 5% , un máximo de $2,5\%$, o un máximo de 1% , de la actividad del polipéptido que tiene la secuencia de
- 50 aminoácidos de SEQ ID NO:2.

En Kohlhaw et al. (Methods in Enzymology 166:423-9 (1988)) se describe un método para determinar la actividad enzimática de isopropilmalato sintasa; el ensayo se basa en medir el cambio en la extinción a 412 nm debido a tionitrobenzoato (TMB) formado a partir de DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico), reactivo de Ellman) mediante reducción con CoA.

- 55 La invención también se refiere de forma correspondiente a secuencias nucleotídicas y moléculas de ácido nucleico

que comprenden tales secuencias y que codifican variantes polipeptídicas de SEQ ID NO:2 o 6, que contienen una o más inserciones o supresiones. Preferiblemente, el polipéptido contiene un máximo de 5, un máximo de 4, un máximo de 3, o un máximo de 2, inserciones o supresiones de aminoácidos.

- 5 Se da preferencia a secuencias nucleotídicas replicables que codifican la enzima isopropilmalato sintasa que se aíslan a partir de microorganismos del género *Corynebacterium*, en particular *Corynebacterium glutamicum*, en las que las secuencias proteicas codificadas de ese modo contienen un aminoácido proteinogénico distinto de L-tirosina en la posición correspondiente a la posición 553 de SEQ ID NO:2.

- 10 Además, se da particular preferencia a una secuencia nucleotídica replicable (ADN) que codifica la enzima isopropilmalato sintasa y que se aísla a partir de microorganismos del género *Corynebacterium*, en particular *Corynebacterium glutamicum*, en la que la secuencia de aminoácidos asociada contiene, en la posición 553, ácido L-aspartico, representada en SEQ ID NO:6.

La invención se refiere además a una secuencia nucleotídica replicable (ADN) que codifica la enzima isopropilmalato sintasa y que se aísla de microorganismos del género *Corynebacterium*, en particular *Corynebacterium glutamicum*, la secuencia base de esa secuencia nucleotídica contiene, en la posición 1657, guanina, ilustrada en SEQ ID NO:5.

- 15 La invención se refiere además a plásmidos y vectores que comprenden las secuencias nucleotídicas según la invención y son opcionalmente adecuados para la replicación en microorganismos del género *Corynebacterium*.

La invención se refiere además a microorganismos del género *Corynebacterium* que comprenden las secuencias nucleotídicas, vectores y polipéptidos según la invención.

- 20 La invención se refiere además a un polipéptido de isopropilmalato sintasa que tiene inhibición de retroacción reducida con respecto a la enzima de tipo salvaje, que es codificado por la secuencia nucleotídica según la invención. Un polipéptido ejemplar se representa en SEQ ID NO: 6.

- 25 En una realización particularmente preferida, el polipéptido codificado por la secuencia nucleotídica según la invención es una IPMS modificada que tiene inhibición de retroacción reducida con respecto a la enzima de tipo salvaje, es decir, la enzima está menos inhibida que la enzima de tipo salvaje por uno de sus productos o un metabolito formado a partir del mismo en el metabolismo, por ejemplo KIC o L-leucina.

La invención se refiere además preferiblemente a microorganismos del género *Corynebacterium* que comprende las secuencias nucleotídicas, vectores y/o polipéptidos según la invención, y en cuyos microorganismos las secuencias nucleotídicas que codifican la isopropilmalato sintasa están presentes preferiblemente en forma sobreexpresada.

- 30 La invención se refiere además de forma particularmente preferible a microorganismos del género *Corynebacterium* que contienen las secuencias nucleotídicas según la invención, y en los cuales las secuencias nucleotídicas que codifican la isopropilmalato sintasa están presentes preferiblemente en forma sobreexpresada, en los que la secuencia de aminoácidos asociada contiene ácido L-aspartico en la posición 553, representada en SEQ ID NO:6.

- 35 Para generar las secuencias nucleotídicas según la invención que codifican α -isopropilmalato sintasa caracterizadas por un intercambio de aminoácidos en la posición 553 de SEQ ID NO:2, se usan métodos de mutagénesis descritos en la técnica anterior.

Para la mutagénesis, se pueden usar métodos in vitro tales como, por ejemplo, oligonucleótidos mutagénicos (T. A. Brown: *Gentechnologie für Einsteiger* [Genetic engineering for beginners], Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1993), o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como se describe en el manual por Newton y Graham (PCR, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1994).

- 40 En la técnica anterior y en libros de texto conocidos de genética y biología molecular se pueden encontrar instrucciones adicionales para generar mutaciones, tales como, por ejemplo, el libro de texto por Knippers ("Molekulare Genetik" [Molecular genetics], 6ª edición, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Alemania, 1995), el de Winnacker ("Gene und Klone" [Genes and clones], VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1990) o el de Hagemann ("Allgemeine Genetik" [General genetics], Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986).

- 45 Cuando se usan métodos in vitro, el gen *leuA* descrito en la técnica anterior, partiendo de ADN total aislado de una cepa de tipo salvaje, se amplifica usando la reacción en cadena de la polimerasa, opcionalmente se clona en vectores plasmídicos adecuados, y el ADN se somete entonces al proceso de mutagénesis. Las instrucciones para amplificar secuencias de ADN usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se pueden encontrar por aquellos expertos en la técnica, entre otros, en el manual por Gait: *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, UK, 1984) y en Newton y Graham: *PCR* (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Alemania, 1994). Entonces los alelos de *leuA* adecuados se aíslan, se estudian y se secuencian. Las instrucciones para este fin se pueden encontrar, por ejemplo, en Kalinowski et al. (*Molecular and General Genetics* 224: 317-324 (1990)), Kalinowski et al. (*Molecular Microbiology* 5:1197-204 (1991)) o Follett et al. (*Journal of Bacteriology* 175, 4096-4103 (1993)). Las instrucciones sobre secuenciación se pueden encontrar, por ejemplo, en Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, (1977)).
- 55

Por lo tanto, la invención se refiere a un polinucleótido aislado que codifica la enzima isopropilmalato sintasa, polinucleótido aislado el cual comprende un polinucleótido que tiene la secuencia nucleotídica representada en SEQ ID NO:5.

5 La invención se refiere además a un polinucleótido aislado que codifica la enzima isopropilmalato sintasa, polinucleótido aislado el cual comprende la secuencia nucleotídica representada en SEQ ID NO:5 o consiste en la misma.

10 Los detalles sobre la bioquímica o estructura química de las secuencias nucleotídicas como aparecen en criaturas vivas, tales como, por ejemplo, microorganismos, se pueden encontrar, entre otros, en el manual "Biochemie" [Biochemistry] por Berg et al. (Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlín, Alemania, 2003; ISBN 3-8274-1303-6).

En una realización preferida, la expresión "secuencia nucleotídica" o "secuencia de aminoácidos" se toma para significar moléculas de ácido nucleico del grupo que comprende ADN, ARN y sus formas modificadas, o polipéptidos que comprenden la secuencia especificada, por ejemplo en fusión con otra secuencia, o consiste en la misma.

15 Si la secuencia nucleotídica consiste en monómeros desoxirribonucleotídicos que tienen las nucleobases o bases adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T), entonces esto se describe como secuencia desoxirribonucleotídica o ácido desoxirribonucleico (ADN). Si la secuencia nucleotídica consiste en monómeros ribonucleotídicos que tienen las nucleobases o bases adenina (A), guanina (G), citosina (C) y uracilo (U), entonces esto se describe como secuencia ribonucleotídica o ácido ribonucleico (ARN). En dichas secuencias nucleotídicas, los monómeros están unidos covalentemente entre sí vía un enlace de 3' → 5'-fosfodiéster.

20 Un gen, desde el punto de vista químico, es una secuencia nucleotídica. Una secuencia nucleotídica que codifica una proteína/polipéptido se usa aquí de forma sinónima con la expresión "gen". Las dos expresiones "gen" y "región codificante" se usan de forma sinónima, y, de la misma manera, las dos expresiones "proteína" y "polipéptido".

25 "Aminoácidos proteinogénicos" se toman para significar los aminoácidos que aparecen en proteínas naturales, es decir, en proteínas de microorganismos, plantas, animales y seres humanos. Sirven como unidades estructurales para proteínas en las que están enlazadas entre sí vía enlaces peptídicos.

30 En lo sucesivo aquí, si se mencionan L-aminoácidos proteinogénicos, esto significa uno o más de los aminoácidos, incluyendo sus sales, seleccionados del grupo de ácido L-aspartico, L-asparagina, L-treonina, L-serina, ácido L-glutámico, L-glutamina, L-glicina, L-alanina, L-cisteína, L-valina, L-metionina, L-isoleucina, L-leucina, L-tirosina, L-fenilalanina, L-histidina, L-lisina, L-triptófano, L-arginina, L-prolina y, opcionalmente, L-selenocisteína y L-pirrolisina. Igualmente, los L-aminoácidos incluyen L-homoserina. Se da particular preferencia al L-aminoácido L-leucina.

Sobreexpresión se toma para significar, en general, un incremento en la concentración intracelular o actividad de un ácido ribonucleico, una proteína (polipéptido) o una enzima, en comparación con la cepa de partida (cepa progenitora) o cepa de tipo salvaje, si esta es la cepa de partida. Una cepa de partida (cepa progenitora) se toma para significar la cepa sobre la cual se llevó a cabo la medida que conduce a la sobreexpresión.

35 En la sobreexpresión, se prefieren los métodos de sobreexpresión recombinante. Estos incluyen todos los métodos en los cuales se produce un microorganismo usando una molécula de ADN proporcionada in vitro. Tales moléculas de ADN comprenden, por ejemplo, promotores, casetes de expresión, genes, alelos, regiones codificantes, etc. Estas se convierten en el microorganismo deseado mediante métodos de transformación, conjugación, transducción, o métodos similares.

40 El grado de expresión o sobreexpresión se puede establecer midiendo la cantidad del ARNm transcrito por el gen, determinando la cantidad del polipéptido, y determinando la actividad enzimática.

45 Para determinar la cantidad de ARNm, se puede usar, entre otros, el método de transferencia Northern y la RT-PCR cuantitativa. En la RT-PCR cuantitativa, se conecta una transcripción inversa aguas arriba de la reacción en cadena de la polimerasa. Para este fin, se puede usar el sistema LightCycler™ de Roche Diagnostics (Boehringer Mannheim GmbH, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania), como se describe, por ejemplo, en Jungwirth et al. (FEMS Microbiology Letters 281, 190-197 (2008)). La concentración de la proteína se puede determinar mediante separación en gel de proteína uni- y bidimensional e identificación óptica subsiguiente de la concentración de proteína en el gel usando el software de evaluación correspondiente. Un método habitual para la preparación de los geles de proteína para bacterias corineformes, y para identificar las proteínas, es el procedimiento descrito por Hermann et al. (Electrophoresis, 22:1712-23 (2001)). La concentración de proteína se puede determinar igualmente mediante hibridación de transferencia Western con un anticuerpo específico para la proteína que se va a detectar (Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual. 2ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) y evaluación óptica subsiguiente con el software correspondiente para determinar la concentración (Lohaus y Meyer (1998) Biospektrum 5:32-39; Lottspeich, Angewandte Chemie 321: 2630-2647 (1999)). La significancia estadística de los datos obtenidos se determinan usando una prueba de la T (Gosset, Biometrika 6(1): 1-25 (1908)).

Para lograr la sobreexpresión, existe en la técnica anterior una multitud de métodos. Estos incluyen, además de modificar las secuencias nucleotídicas que controlan la expresión del gen, incrementar también el número de copias.

El número de copias se puede incrementar mediante plásmidos que se replican en el citoplasma del microorganismo. Para este fin, en la técnica anterior se describe una abundancia de plásmidos para los grupos más variados de microorganismos, plásmidos con los cuales se puede ajustar el incremento deseado en el número de copias del gen. Los plásmidos adecuados para el género *Corynebacterium* se describen, por ejemplo, en Tauch et al. (Journal of Biotechnology 104 (1-3), 27-40, (2003)), o en Stansen et al. (Applied and Environmental Microbiology 71, 5920-5928 (2005)).

El número de copias se puede incrementar adicionalmente en al menos una (1) copia insertando copias adicionales en el cromosoma del microorganismo. Los métodos adecuados para el género *Corynebacterium* se describen, por ejemplo, en los documentos de patente WO 03/014330, WO 03/040373 y WO 04/069996.

La expresión del gen se puede incrementar adicionalmente por cuanto que una pluralidad de promotores se sitúan en dirección 5' del gen deseado, o están enlazados funcionalmente al gen que se va a expresar, y de esta manera se logra la expresión incrementada. Sus ejemplos se describen en el documento de patente WO 2006/069711.

La transcripción de un gen se puede controlar mediante proteínas que suprimen la transcripción (proteínas represoras) o que la promueven (proteínas activadoras). Por lo tanto, para lograr la sobreexpresión, es igualmente posible incrementar la expresión de proteínas activadoras o reducir la activación de proteínas represoras, o apagarlas, o también eliminar los sitios de unión de las proteínas represoras.

El grado de alargamiento se ve afectado por el uso de codones; el uso de codones para los ARN de transferencia (t) que aparecen frecuentemente en la cepa de partida puede amplificar la traducción. Además, el intercambio de un codón de partida por el codón ATG que aparece muy frecuentemente en muchos microorganismos (77% en *Escherichia coli*) puede potenciar considerablemente la traducción, puesto que, al nivel del ARN, el codón AUG es dos a tres veces más eficaz que, por ejemplo, los codones GUG y UUG (Khudyakov et al., FEBS Letters 232(2):369-71 (1988); Reddy et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 82(17):5656-60 (1985)). También, el entorno de la secuencia del codón de partida se puede optimizar, puesto que se han descrito efectos interactivos entre el codón de partida y las regiones de flaqueo (Stenstrom et al., Gene 273(2):259-65 (2001); Hui et al., EMBO Journal 3(3):623-9 (1984)).

Las instrucciones sobre la manipulación del ADN, la digestión y ligación del ADN, la transformación y cribado de transformantes, se pueden encontrar, entre otros, en el manual conocido por Sambrook et al. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Segunda Edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

La invención también se refiere a vectores que comprenden el polinucleótido según la invención.

Kirchner y Tauch (Journal of Biotechnology 104:287-299 (2003)) describen una selección de los vectores a emplear en *Corynebacterium glutamicum*.

La invención se refiere además a un microorganismo según la invención, caracterizado por que la secuencia nucleotídica según la invención está integrada en un cromosoma. La recombinación homóloga permite, con el uso de los vectores según la invención, el intercambio de secciones de ADN en el cromosoma por polinucleótidos según la invención que son transportados a la célula por el vector. Para la recombinación eficiente entre la molécula de ADN de tipo anular del vector y el ADN diana en el cromosoma, la región del ADN que se va a intercambiar que contiene el polinucleótido según la invención se proporciona en los extremos con secuencias nucleotídicas homólogas al sitio diana. Estas determinan el sitio de integración del vector y de intercambio del ADN.

Por ejemplo, el polinucleótido según la invención se puede intercambiar con el gen *leuA* nativo en el sitio del gen nativo en el cromosoma, o se puede integrar en un sitio génico adicional.

La expresión o sobreexpresión se lleva a cabo preferiblemente en microorganismos del género *Corynebacterium*. Dentro del género *Corynebacterium*, se prefieren cepas que se basan en las siguientes especies: *Corynebacterium efficiens*, en la que la cepa tipo está depositada como DSM44549, *Corynebacterium glutamicum*, en la que la cepa tipo está depositada como ATCC13032, y *Corynebacterium ammoniagenes*, en la que la cepa tipo está depositada como ATCC6871. Se prefiere muy particularmente la especie *Corynebacterium glutamicum*.

Algunos miembros de la especie *Corynebacterium glutamicum* también son conocidos en la técnica anterior bajo otros nombres. Estos incluyen, por ejemplo: la cepa ATCC13870, que se ha denominado *Corynebacterium acetoacidophilum*, la cepa DSM20137, que se ha denominado *Corynebacterium lilium*, la cepa ATCC17965, que se ha denominado *Corynebacterium melassecola*, la cepa ATCC14067, que se ha denominado *Brevibacterium flavum*, la cepa ATCC13869, que se ha denominado *Brevibacterium lactofermentum*, y la cepa ATCC14020, que se ha denominado *Brevibacterium divaricatum*.

Igualmente se ha usado la expresión "*Micrococcus glutamicus*" para *Corynebacterium glutamicum*. Algunos miembros de la especie *Corynebacterium efficiens* también se han denominado en la técnica anterior

Corynebacterium thermoaminogenes, tal como, por ejemplo, la cepa FERM BP-1539.

Los microorganismos o cepas (cepas de partida) usados para las medidas de introducir una IPMS resistente a la retroacción preferiblemente ya poseen la capacidad de segregar KIC o L-leucina en el medio nutriente circundante y acumularlo allí. Para este proceso, en lo sucesivo aquí también se usa la expresión “producir”. En particular, las cepas usadas para las medidas de sobreexpresión poseen la capacidad de acumular en la célula o en el medio nutriente ($\geq$ significa al menos) $\geq 0,10$ g/l, $\geq 0,25$ g/l, $\geq 0,5$ g/l, $\geq 1,0$ g/l, $\geq 1,5$ g/l, $\geq 2,0$ g/l, ≥ 4 g/l o ≥ 10 g/l de L-leucina o KIC en ($\leq$ significa como máximo) ≤ 120 horas, ≤ 96 horas, ≤ 48 horas, ≤ 36 horas, ≤ 24 horas o ≤ 12 horas.

Las cepas de partida son preferiblemente cepas que se produjeron mediante mutagénesis y cribado, mediante técnicas de ADN recombinante, o mediante una combinación de ambos métodos.

- 5 Es comprensible para los expertos en la técnica que también es posible llegar a un microorganismo adecuado para las medidas de la invención por cuanto, en una cepa salvaje, tal como, por ejemplo, en la cepa tipo de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, o en la cepa ATCC 14067, primeramente se inserta el polinucleótido según la invención de acuerdo con SEQ ID NO:5, y entonces se provoca que el microorganismo, mediante medidas genéticas adicionales descritas en la técnica anterior, produzca la KIC o L-leucina deseada.
- 15 La información sobre la clasificación taxonómica de las cepas de este grupo de bacterias se puede encontrar, entre otros, en Seiler (Journal of General Microbiology 129, 1433-1477 (1983)), Kinoshita (1985, Glutamic Acid Bacteria, p. 115-142. En: Demain and Solomon (ed), Biology of Industrial Microorganisms. The Benjamin/Cummings Publishing Co., Londres, UK), Kämpfer y Kroppenstedt (Canadian Journal of Microbiology 42, 989-1005 (1996)), Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41, 255-260 (1991)) y en el documento US-A-5.250.434.
- 20 Las cepas que tienen la designación “ATCC” se pueden obtener de la American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Las cepas que tienen la designación “DSM” se pueden obtener de la German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Brunswick, Alemania). Las cepas que tienen la designación “NRRL” se pueden obtener de la Agricultural Research Service Patent Culture Collection (ARS, Peoria, Illinois, US). Las cepas que tienen la designación “FERM” se pueden obtener del National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba Ibaraki, Japón).
- 25

Las cepas que segregar o que producen KIC se basan, por ejemplo, en:

Corynebacterium glutamicum, cepa ATCC13032,
Brevibacterium flavum, cepa ATCC 14067 y
Brevibacterium lactofermentum, cepa ATCC 13869.

- 30 En combinación con la producción de cetoisocaproato, además, preferiblemente se (sobre)expresan uno o más genes de las secuencias nucleotídicas que codifican enzimas de la biosíntesis de cetoisocaproato, seleccionados del grupo:
 - a) polinucleótidos (gen *ilvB* y gen *ilvN*) que codifican las subunidades de una acetolactato sintasa (*IlvBN*, EC No.: 4.1.3.18)
 - 35 b) polinucleótido (gen *ilvC*) que codifica una isomeroreductasa (*IlvC*, EC No.: 1.1.1.86)
 - c) polinucleótido (gen *ilvD*) que codifica una dihidroxiácido deshidratasa (*IlvD*, EC No.: 4.2.1.9)
 - d) polinucleótido (gen *ilvE*) que codifica una transaminasa (*IlvE*, EC No.: 2.6.1.42)
 - e) polinucleótido (gen *leuA*) que codifica una isopropilmalato sintasa (*LeuA*, EC No.: 2.3.3.13)
 - f) polinucleótido (gen *leuB*) que codifica un isopropilmalato deshidrogenasa (*LeuB*, EC No.: 1.1.1.85)
 - 40 g) polinucleótido (gen *leuC*) que codifica la subunidad grande de una isopropilmalato isomerasa (*LeuC*, EC No.: 4.2.1.33)
 - h) polinucleótido (gen *leuD*) que codifica la subunidad pequeña de una isopropilmalato isomerasa (*LeuD*, EC No.: 4.2.1.33)

en los que los genes *ilvBN*, *ilvC*, *ilvD*, *leuA*, *leuB*, *leuC* y *leuD* se prefieren particularmente para ácido α -cetoisocaproico (KIC).

La presente invención proporciona un microorganismo que produce KIC o L-leucina, en el que el microorganismo tiene una α -isopropilmalato sintasa resistente a la retroacción debido al uso del polinucleótido según la invención de acuerdo con SEQ ID NO: 5.

El procedimiento fermentativo para producir la sustancia química fina KIC o L-leucina comprende las siguientes

etapas:

- a) fermentar uno de los microorganismos según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12 en un medio,
- b) acumular el KIC o la L-leucina en el medio, en el que se obtiene un caldo de fermentación. En este caso se prefiere que la sustancia química fina o un producto líquido o sólido que contiene la sustancia química fina se obtenga a partir del caldo de fermentación que contiene la sustancia química fina.

El uso de tal procedimiento según la invención conduce, como se muestra en el Ejemplo 4 con referencia a la producción de cetoisocaproato, o como se muestra en el Ejemplo 5 con referencia a la producción de L-leucina, a un incremento extraordinario en el rendimiento en comparación con la cepa de partida respectiva (Ejemplo 4, KIC: 0,027 g/g frente a 0,012 g/g; Ejemplo 5, leucina: 0,041 g/g frente a 0,002 g/g).

Además, se prefiere particularmente que el microorganismo según la invención produzca KIC o L-leucina, aún más preferiblemente, segregue KIC o L-leucina al medio. Los microorganismos producidos se pueden cultivar de forma continua – como se describe, por ejemplo, en el documento WO 05/021772 –, o de forma discontinua en el procedimiento por lotes (cultivo por lotes o procedimiento por lotes), o en el procedimiento por lote alimentado o por lote alimentado repetitivo, con el fin de producir el compuesto químico orgánico deseado. En el manual por Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik [Process biotechnology 1. Introduction to bioengineering] (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)), o en el libro de texto por Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen [Bioreactors and periphery equipment] (Vieweg Verlag, Brunswick/Wiesbaden, 1994)), hay disponible un resumen de un tipo general en métodos de cultivo conocidos.

El medio de cultivo o medio de fermentación que se va a usar debe satisfacer muy apropiadamente las demandas de las cepas respectivas. Las descripciones de los medios de cultivo de diversos microorganismos están contenidos en el manual "Manual of Methods for General Bacteriology" de la American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981). Las expresiones medio de cultivo y medio de fermentación o medio son mutuamente intercambiables.

Como fuente de carbono, se pueden usar azúcares e hidratos de carbono, tales como, por ejemplo, glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melazas, disoluciones que contienen sacarosa a partir del procesamiento de remolacha o de caña de azúcar, almidón, hidrolizado de almidón y celulosa, aceites y grasas, tales como, por ejemplo, aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y grasa de coco, ácidos grasos, tales como, por ejemplo, ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes tales como, por ejemplo, glicerol, metanol y etanol, y ácidos orgánicos, tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido láctico.

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

Como fuente de fósforo, se puede usar ácido fosfórico, dihidrogenofosfato potásico, o hidrogenofosfato dipotásico, o las sales correspondientes que contienen sodio.

El medio de cultivo debe contener, además, sales, por ejemplo en forma de cloruros o sulfatos de metales tales como, por ejemplo, sodio, potasio, magnesio, calcio y hierro, tales como, por ejemplo, sulfato de magnesio o sulfato de hierro, que son necesarios para el crecimiento. Finalmente, además de las sustancias mencionadas anteriormente, se pueden usar sustancias esenciales para el crecimiento, tales como aminoácidos, por ejemplo homoserina, y vitaminas, por ejemplo tiamina, biotina o ácido pantoténico.

Dichos materiales de partida se pueden añadir al cultivo en forma de un único lote, o se pueden suministrar de una manera adecuada durante el cultivo.

Para el control del pH del cultivo, se usan de manera adecuada compuestos básicos tales como hidróxido sódico, hidróxido potásico, amoníaco, o agua amoniacal, o compuestos ácidos tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. El pH se ajusta generalmente a 6,0 a 8,5, preferiblemente 6,5 a 8. Para el control del desarrollo de espuma, se pueden usar antiespumantes, tales como, por ejemplo, ésteres poliglicólicos de ácidos grasos. Para mantener la estabilidad de los plásmidos, se pueden añadir al medio sustancias adecuadas que actúan selectivamente, tales como, por ejemplo, antibióticos. La fermentación se lleva a cabo preferiblemente en condiciones aerobias. A fin de mantener dichas condiciones aerobias, se introducen en el cultivo oxígeno o mezclas de gases que contienen oxígeno, tales como, por ejemplo, aire. Igualmente es posible el uso de líquidos que están enriquecidos con peróxido de hidrógeno. Opcionalmente, la fermentación se lleva a cabo a presión superatmosférica, por ejemplo a una presión superatmosférica de 0,03 a 0,2 MPa. La temperatura del cultivo es habitualmente 20°C a 45°C, y preferiblemente 25°C a 40°C, de forma particularmente preferible 30°C a 37°C. En el caso de los procedimientos por lotes o por lotes alimentados, el cultivo se continúa preferiblemente hasta que se ha formado una cantidad suficiente para la medida de obtener el compuesto químico orgánico deseado. Esta meta se alcanza habitualmente en 10 horas a 160 horas. En los procedimientos continuos, son posibles tiempos de cultivo más prolongados. Debido a la actividad de los microorganismos, se produce el enriquecimiento (acumulación) de las sustancias químicas finas en el medio de

fermentación y/o en las células de los microorganismos.

Los ejemplos de medios de fermentación adecuados se pueden encontrar, entre otros, en los documentos de patente US 5.770.409, US 5.990.350, US 5.275.940, WO 2007/012078, US 5.827.698, WO 2009/043803, US 5.756.345 o US 7.138.266; opcionalmente se pueden llevar a cabo modificaciones apropiadas para los requisitos de las cepas usadas.

Los L-aminoácidos se pueden analizar para la determinación de la concentración en uno o más puntos de tiempo durante el transcurso de la fermentación mediante separación de los L-aminoácidos por medio de cromatografía de intercambio iónico, preferiblemente cromatografía de intercambio catiónico, con derivatización post-columna subsiguiente, usando ninhidrina, como se describe en Spackman et al. (Analytical Chemistry 30: 1190-1206 (1958)). En lugar de ninhidrina, también se puede usar orto-ftaldialdehído para la derivatización post-columna. En Pickering (LC·GC (Magazine of Chromatographic Science) 7(6), 484-487 (1989)) se puede encontrar un artículo de repaso sobre la cromatografía de intercambio iónico.

Igualmente es posible llevar a cabo una derivatización precolumna, por ejemplo usando orto-ftaldialdehído o fenilisotiocianato, y separar los derivados de aminoácidos resultantes mediante cromatografía de fase inversa (RP) preferiblemente en forma de cromatografía de líquidos de altas prestaciones (HPLC). Tal método se describe, por ejemplo, en Lindroth et al. (Analytical Chemistry 51: 1167-1174 (1979)).

La detección transcurre fotométricamente (absorción, fluorescencia).

En el libro de texto "Bioanalytik" [Bioanalysis] por Lottspeich y Zorbas (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Alemania 1998) se puede encontrar, entre otros, una presentación de resumen sobre el análisis de aminoácidos.

El análisis de α -cetoácidos tal como KIC para determinar la concentración en uno o más puntos de tiempo durante el transcurso de la fermentación se puede llevar a cabo separando los cetoácidos y otros productos de secreción por medio de cromatografía de intercambio iónico, preferiblemente cromatografía de intercambio catiónico, sobre un polímero de estireno-divinilbenceno sulfonado, en forma H⁺, por ejemplo usando ácido sulfúrico 0,025 N, con detección subsiguiente mediante UV a 215 nm (como alternativa, también a 230 o 275 nm). Preferiblemente, se puede usar la columna REZEX RFQ - Fast Fruit H⁺ (Phenomenex); son posibles otros proveedores para la fase de separación (por ejemplo Aminex de BioRad). En los ejemplos de aplicación correspondientes de los proveedores se describen separaciones similares.

El comportamiento de los procedimientos o de los procedimientos de fermentación según la invención con respecto a uno o más de los parámetros seleccionados del grupo de concentración (compuesto formado por volumen), rendimiento (compuesto formado por fuente de carbono consumida), formación (compuesto formado por volumen y tiempo) y formación específica (compuesto formado por masa seca celular o biomasa seca y tiempo, o compuesto formado por proteína celular y tiempo), u otros parámetros del procedimiento, y sus combinaciones, está incrementado en al menos 0,5%, al menos 1%, al menos 1,5%, o al menos 2%, basado en los procedimientos o procedimientos de fermentación con microorganismos en los que está presente la variante del promotor según la invención.

Debido a las medidas de la fermentación, se obtiene un caldo de fermentación que contiene la sustancia química fina deseada, preferiblemente aminoácido o ácido orgánico.

Entonces, se proporciona o produce u obtiene un producto en forma líquida o sólida que contiene la sustancia química fina.

Un caldo de fermentación se toma para significar, en una realización preferida, un medio de fermentación o un medio nutriente en el que se cultivó un microorganismo durante cierto tiempo y a cierta temperatura. El medio de fermentación, o los medios usados durante la fermentación, contiene/contienen todas las sustancias o componentes que aseguran la producción del compuesto deseado, y aseguran típicamente el crecimiento y/o viabilidad.

Al terminar la fermentación, el caldo de fermentación resultante contiene en consecuencia

- a) la biomasa (masa celular) del microorganismo que resulta del crecimiento de las células del microorganismo,
- b) la sustancia química fina deseada formada durante el transcurso de la fermentación,
- c) los subproductos orgánicos formados posiblemente durante el transcurso de la fermentación, y
- d) los componentes del medio de fermentación usado, o de los materiales de partida, que no se consumen por la fermentación, tal como, por ejemplo, vitaminas tales como biotina, o sales tales como sulfato de magnesio.

Los subproductos orgánicos incluyen sustancias que se generan, además del compuesto deseado respectivo, por los microorganismos usados en la fermentación y se segregan posiblemente.

El caldo de fermentación se extrae de la vasija de cultivo o del recipiente de fermentación, opcionalmente se recoge, y se usa para proporcionar un producto en forma líquida o sólida que contiene la sustancia química fina. La expresión "obtener el producto que contiene la sustancia química fina" también se usa para ello. En el caso más simple, el caldo de fermentación que contiene la sustancia química fina extraído del recipiente de fermentación es el propio producto obtenido.

Por medio de una o más de las medidas seleccionadas del grupo

a) eliminación parcial ($> 0\%$ a $< 80\%$) a completa (100%) o virtualmente completa ($\geq 80\%$, $\geq 90\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$, $\geq 99\%$) del agua,

b) eliminación parcial ($> 0\%$ a $< 80\%$) a completa (100%) o virtualmente completa ($\geq 80\%$, $\geq 90\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$, $\geq 99\%$) de la biomasa, en el que esta es inactivada opcionalmente antes de la retirada,

c) eliminación parcial ($> 0\%$ a $< 80\%$) a completa (100%) o virtualmente completa ($\geq 80\%$, $\geq 90\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$, $\geq 99\%$, $\geq 99,3\%$, $\geq 99,7\%$) de los subproductos orgánicos formados durante el transcurso de la fermentación, y

d) eliminación parcial ($> 0\%$) a completa (100%) o virtualmente completa ($\geq 80\%$, $\geq 90\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$, $\geq 99\%$, $\geq 99,3\%$, $\geq 99,7\%$) de los componentes del medio de fermentación usado, o los materiales de partida que no se consumen por la fermentación,

se logra una concentración o purificación del compuesto químico orgánico deseado a partir del caldo de fermentación. De esta manera, se aíslan productos que tienen un contenido deseado del compuesto.

La eliminación parcial ($> 0\%$ a $< 80\%$) a completa (100%) o virtualmente completa ($\geq 80\%$ a $< 100\%$) del agua (medida a)) también se denomina secado.

En una variante del procedimiento, por eliminación completa o virtualmente completa del agua, de la biomasa, de los subproductos orgánicos y de los componentes no consumidos del medio de fermentación usado, se llega exitosamente a formas del producto puras ($\geq 80\%$ en peso, $\geq 90\%$ en peso) o de alta pureza ($\geq 95\%$ en peso, $\geq 97\%$ en peso, $\geq 99\%$ en peso) del compuesto químico orgánico deseado, preferiblemente L-aminoácidos. Para las medidas según a), b), c) o d), existe en la técnica anterior una gran variedad de instrucciones técnicas.

En el caso de procedimientos para producir KIC o L-leucina, usando bacterias del género *Corynebacterium*, se prefieren procedimientos en los que se obtienen productos que no contienen ninguno de los componentes del caldo de fermentación. Estos productos se usan, en particular, en medicina humana, en la industria farmacéutica, y en la industria alimentaria.

El procedimiento según la invención sirve para la producción fermentativa de KIC o L-leucina.

La invención finalmente se refiere al uso del microorganismo según la invención para la producción fermentativa de KIC o L-leucina.

La presente invención se describirá con más detalle aquí en lo sucesivo con referencia a realizaciones ejemplares.

Ejemplo 1

Producción del vector de intercambio pK18mobsacB_leuA_Y553D

La síntesis de un constructo de intercambio largo de 812 pb se llevó a cabo en (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Alemania) (véase SEQ ID NO:7). El fragmento contiene los últimos 594 pb del gen leuA de tipo salvaje (término C) a 206 pb de la región en dirección 3' del gen leuA de ATCC13032, y también tanto los sitios de corte de SphI y BamHI requeridos para la clonación en el vector pK18mobsacB. En la posición 195, en dirección 5' del extremo 3' del gen leuA, en este fragmento de intercambio la base T se muta a la base G – esto cambia el codón de tipo salvaje TAC (que codifica el aminoácido Y, tirosina) por el codón GAC (que codifica el aminoácido D, aspartato). La clonación del fragmento en el vector pK18mobsacB se llevó a cabo en la compañía GeneArt. El vector de intercambio resultante pK18mobsacB_leuA_Y553D fue suministrado por GeneArt, y se usó para producir las cepas de los ejemplos (véase Ejemplo 3).

Ejemplo 2

Producción de la cepa de *C. glutamicum* ATCC13032_DilvE

La cepa de *C. glutamicum* ATCC13032 se transformó con el plásmido pK19mobsacB_DilvE (Marienhagen et al., Journal of Bacteriology 187:7639-7646 (2005)) mediante electroporación. La electroporación se llevó a cabo según el protocolo de Haynes et al. (FEMS Microbiology Letters 61: 329-334 (1989)).

El plásmido pK18mobsacB o pK18mobsacB_DilvE no se puede replicar de forma independiente en *C. glutamicum*

ATCC13032, y solamente es retenido en la célula si, como consecuencia de un suceso de recombinación, se ha integrado en el cromosoma. El cribado de clones que tiene un pK18mobsacB_DilvE integrado se llevó a cabo sembrando en placas el lote de electroporación sobre agar LB (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989), que se ha suplementado con 15 mg/l de kanamicina. Los clones que crecieron se rallaron sobre placas de agar LB que contienen 25 mg/l de kanamicina, y se incubaron durante 16 horas a 33°C. Para cribar mutantes en los que se ha escindido el plásmido como consecuencia de un segundo suceso de recombinación, los clones se cultivaron durante 20 horas de forma no selectiva en medio líquido LB (+ 5 g/l de acetato de potasio), después se rallaron sobre agar LB que contiene 10% de sacarosa, y se incubaron durante 24 horas.

El plásmido pK18mobsacB_DilvE contiene, igual que el plásmido de partida pK18mobsacB, además del gen de resistencia a kanamicina, una copia del gen sacB que codifica la levano sacarasa de *Bacillus subtilis*. La expresión inducible por sacarosa conduce a la formación de levano sacarasa, que cataliza la síntesis de levano, el producto tóxico para *C. glutamicum*. En agar LB (que contiene 5 g/l de acetato potásico), con sacarosa, por lo tanto, solamente crecen aquellos clones en los que nuevamente se ha cortado el pK18mobsacB integrado. En el corte, junto con el plásmido, se puede cortar la copia cromosómica completa de ilvE, o la copia incompleta con la supresión interna de ilvE.

Se examinaron aproximadamente 40 a 50 colonias en busca del genotipo “crecimiento en presencia de sacarosa” y “sin crecimiento en presencia de kanamicina”. A fin de detectar que el alelo de ilvE suprimido ha permanecido en el cromosoma, se estudiaron aproximadamente 20 colonias que tienen el fenotipo “crecimiento en presencia de sacarosa” y “sin crecimiento en presencia de kanamicina” según el método de PCR estándar de Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, 1990, Academic Press) usando la reacción en cadena de la polimerasa. En este caso, a partir del ADN cromosómico de las colonias, se amplificó un fragmento de ADN que porta las regiones circundantes de la región de ilvE suprimida. Se seleccionaron para la PCR los siguientes oligonucleótidos cebadores.

ilvE-Xbal-fw 5'-gctctagagccaagcctagccattcctcaa-3'

ilvE-Xbal-rev 5'-gctctagagccagccactgcattctcctta-3'

Los cebadores permiten, en clones de control que tienen el locus de ilvE completo, la amplificación de un fragmento de ADN de un tamaño de aproximadamente 1,4 kb. En los clones que tienen un locus de argFRGH suprimido, se amplificaron fragmentos de ADN que tienen un tamaño de aproximadamente 0,6 kb.

Los fragmentos de ADN amplificados se identificaron mediante electroforesis en gel de agarosa de concentración 0,8%. Se pudo mostrar de ese modo que la cepa porta en el cromosoma un alelo de ilvE suprimido. La cepa se denominó *C. glutamicum* ATCC13032_DilvE, y se estudió en el ensayo de producción (véase el Ejemplo 4) para determinar su capacidad para producir isocaproato.

Ejemplo 3

Producción de la cepa *C. glutamicum* ATCC13032_DilvE_leuAY553D y *C. glutamicum* ATCC13032_leuAY553D

La cepa *C. glutamicum* ATCC13032 y la cepa *C. glutamicum* ATCC13032_DilvE del Ejemplo 2 se transformaron mediante electroporación con el plásmido pK18mobsacB_leuA_Y553D del Ejemplo 1. El método se describe en detalle en el Ejemplo 2.

El intercambio del codón de tipo salvaje TAC (que codifica tirosina en la posición 553) por el codón GAC (que codifica aspartato en la posición 553) se demostró secuenciando una pluralidad de clones candidatos del fenotipo “crecimiento en presencia de sacarosa” y “sin crecimiento en presencia de kanamicina”. Para este fin, primeramente se produjo un fragmento de PCR de leuA-1 (767 pb de longitud) que tiene los cebadores leuA1 (5'-GATCTATCTAGATTGAGGCCTTGCGCATACG-3') y leuA-2 (5'-GATCTAGGATCCGCGACTACGAGGCTGTTATC-3'), y se secuenció con el cebador leuA-3 (5'-GATCTATCTAGAAAGCTTAAACGCCGCCAGCC-3'). Los clones candidatos positivos se seleccionaron y examinaron en el ensayo de comportamiento subsiguiente (Ejemplos 4 y 5).

Ejemplo 4

Producción de cetoisocaproato con *C. glutamicum* ATCC13032, *C. glutamicum* ATCC13032_DilvE y *C. glutamicum* ATCC13032_DilvE_leuAY553D

Para estudiar su capacidad para producir cetoisocaproato, las cepas *C. glutamicum* ATCC13032, *C. glutamicum* ATCC13032_DilvE y *C. glutamicum* ATCC13032_DilvE_leuAY553D se precultivaron en 10 ml de medio de ensayo en cada caso durante 16 h a 33°C. Para el ensayo de producción, se inoculó cada 10 ml de medio de ensayo con el precultivo resultante de manera que la OD 600 (densidad óptica a 600 nm) de partida fue 0,1. Cada clon se examinó en tres matraces de agitación de manera que cada cepa está representada por un total de nueve matraces de agitación. El medio de ensayo fue idéntico al medio CgXII descrito en Keilhauer et al. (Journal of Bacteriology (1993)

175: 5593-5603), pero adicionalmente contenía en cada caso 200 mg/l de los aminoácidos L-leucina, L-valina y L-isoleucina. En aras de la simplicidad, la composición del medio de ensayo se resume aquí más abajo en la Tabla 1.

Tabla 1: Composición del medio CgXII con adición en cada caso de 200 mg/l de los aminoácidos L-leucina, L-valina y L-isoleucina

Componente	Contenido por l
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g
Urea	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g
Ácido 3-morfolinopropanosulfónico (MOPS)	42 g
CaCl ₂	0,01 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,01 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,001 g
CuSO ₄	0,0002 g
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0,00002 g
Biotina	0,0002 g
Ácido protocatecuico	0,03 g
Glucosa	40 g
L-Valina	0,2 g
L-Isoleucina	0,2 g
L-Leucina	0,2 g
pH (con NaOH)	7

5

El cultivo se llevó a cabo a 33°C y 200 rpm en matraces de agitación de 100 ml. La amplitud del agitador fue 5 cm. Después de 24 horas, las muestras se extrajeron de los cultivos y se determinó la densidad óptica. Subsiguientemente, las células se centrifugaron brevemente (centrífuga de banco de tipo 5415D (Eppendorf) a 13000 rpm, 10 min., temperatura ambiente), y el contenido de glucosa y el contenido de cetoisocaproato se determinaron en el sobrenadante.

10

La densidad óptica se determinó a una longitud de onda de 660 nm usando el fotómetro de placas de microtitulación GENios (Tecan, Reading UK). Las muestras se diluyeron antes de la medida 1:100 con agua desmineralizada. El análisis de KIC para la determinación de la concentración transcurre mediante separación de los cetoácidos y otros productos de secreción mediante cromatografía de intercambio catiónico (columna REZEX RFQ - Fast Fruit H+ (Phenomenex)) en un polímero de estireno-divinilbenceno sulfonado en la forma de H+ usando ácido sulfúrico 0,025 N, con detección subsiguiente mediante UV a 215 nm.

15

Para el cálculo del rendimiento de KIC, la cantidad de KIC formado se dividió entre la cantidad de dextrosa consumida.

Los resultados del experimento del matraz de agitación para la formación de cetoisocaproato se muestran en la Tabla 2.

20

Tabla 2: Formación de cetoisocaproato tras 24 horas de incubación. Abreviaturas: KIC = cetoisocaproato

Tiempo	24 horas		
Cepa	KIC g/l	Rendimiento g/g	OD
ATCC 13032	0	0	28,40 ± 1,10
ATCC 13032_DilvE	0,40 ± 0,03	0,012 ± 0,003	25,91 ± 0,81
ATCC 13032_DilvE_leuAY553D	1,09 ± 0,05	0,027 ± 0,004	25,71 ± 2,20

Ejemplo 5:

Producción de L-leucina con *C. glutamicum* ATCC13032 y *C. glutamicum* ATCC13032_leuAY553D

5 Para investigar su capacidad para producir leucina, las cepas *C. glutamicum* ATCC13032 y *C. glutamicum* ATCC13032_leuAY553D se precultivaron en cada caso en 10 ml de medio de ensayo durante 16 h a 33°C. El ensayo de producción se llevó a cabo de manera similar al Ejemplo 4, con la excepción de una adaptación del medio de ensayo que, para este ensayo, no contiene los suplementos leucina, valina e isoleucina. El medio de ensayo fue idéntico al medio CgXII descrito en Keilhauer et al. (Journal of Bacteriology (1993) 175: 5593-5603).

10 La densidad óptica se determinó a una longitud de onda de 660 nm usando un fotómetro de placas de microtitulación GENios (Tecan, Reading UK). Las muestras se diluyeron antes de la medida 1:100 con agua desmineralizada. La cantidad de leucina formada se determinó usando un analizador de aminoácidos de Eppendorf-BioTronik (Hamburgo, Alemania) mediante cromatografía de intercambio iónico y derivatización post-columna con detección por ninhidrina.

15 En la Tabla 3, se resumen los datos de comportamiento obtenidos a partir del experimento del matraz de agitación en la formación de leucina.

Para el cálculo del rendimiento de leucina, la cantidad de leucina formada se dividió entre la cantidad de dextrosa consumida.

Tabla 3: Formación de leucina tras la incubación durante 24 horas.

Tiempo	24 horas		
Cepa	Leucina g/l	Rendimiento g/g	OD
ATCC 13032	0,05 ± 0,01	0,002 ± 0,001	26,30 ± 1,10
ATCC13032_leuAY553D	1,55 ± 0,07	0,041 ± 0,004	23,55 ± 1,80

20 Figura 1: Mapa del plásmido pK18mobsacB_leuA_Y553D

Las abreviaturas y nombres usados tienen los siguientes significados.

oriV:	origen similar a ColE1 de pMB1
sacB:	el gen sacB que codifica la proteína levano sacarasa
RP4-mob:	sitio de movilización RP4
Kan:	gen de resistencia para kanamicina
leuA-3':	594 pb del gen leuA (término C)

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Evonik Industries AG

<120> Alelos de leuA resistentes a la retroacción

25 <130> 201100362

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1851

<212> ADN

<213> *Corynebacterium glutamicum*

5 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1851)

<223> región codificante de leuA

<400> 1

10

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

ES 2 666 072 T3

cgc atg gac aag gtg cag gtg aag aag ctg gct acc gat gcc gct gaa Arg Met Asp Lys Val Gln Val Lys Lys Leu Ala Thr Asp Ala Ala Glu	576
cta atc aag acc atc gct cag gat tac cca gac acc aac tgg cgc tgg Leu Ile Lys 180 Thr Ile Ala Gln Asp 185 Tyr Pro Asp Thr 190 Trp Arg Trp	624
cag tac tcc cct gag tcc ttc acc ggc act gag gtt gag tac gcc aag Gln Tyr 195 Ser Pro Glu Ser Phe 200 Thr Gly Thr Glu 205 Glu Tyr Ala Lys	672
gaa gtt gtg gac gca gtt gtt gag gtc atg gat cca act cct gag aac Glu Val Val Asp Ala Val Val Glu Val Met Asp 210 Pro Thr Pro Glu Asn 215	720
cca atg atc atc aac ctg cct tcc acc gtt gag atg atc acc cct aac Pro Met Ile Ile Asn Leu Pro Ser Thr Val 220 Glu Met Ile Thr Pro Asn 225	768
gtt tac gca gac tcc att gaa tgg atg cac cgc aat cta aac cgt cgt Val Tyr Ala Asp 230 Ser Ile Glu Trp Met 235 His Arg Asn Leu Asn 240 Arg Arg	816
gat tcc att atc ctg tcc ctg cac ccg cac aat gac cgt ggc acc ggc Asp Ser Ile Ile Leu Ser Leu His 245 Pro His Asn Asp Arg Gly Thr Gly	864
gtt ggc gca gct gag ctg ggc tac atg gct ggc gct gac cgc atc gaa Val Gly Ala Ala Glu Leu Gly Tyr Met Ala Gly Ala Asp Arg Ile Glu	912
ggc tgc ctg ttc ggc aac ggc gag cgc acc ggc aac gtc tgc ctg gtc Gly Cys Leu Phe Gly Asn Gly Glu Arg Thr Gly 250 Asn Val Cys Leu Val 255	960
acc ctg gca ctg aac atg ctg acc cag ggc gtt gac cct cag ctg gac Thr Leu Ala Leu Asn Met Leu Thr Gln Val Asp Pro Gln Leu Asp 260	1008
ttc acc gat ata cgc cag atc cgc agc acc gtt gaa tac tgc aac cag Phe Thr Asp Ile Arg Gln Ile Arg Ser Thr Val Glu Tyr Cys Asn Gln 265	1056
ctg cgc gtt cct gag cgc cac cca tac ggc ggt gac ctg gtc ttc acc Leu Arg Val Pro Glu Arg His Pro Tyr Gly Gly Asp Leu Val Phe Thr 270	1104
gct ttc tcc ggt tcc cac cag gac gct gtg aac aag ggt ctg gac gcc Ala Phe Ser Gly Ser His Gln Asp Ala Val Asn Lys Gly Leu Asp Ala 275	1152
atg gct gcc aag gtt cag cca ggt gct agc tcc act gaa gtt tct tgg Met Ala Ala Lys Val Gln Pro Gly Ala Ser Ser Thr Glu Val Ser Trp 280	1200
gag cag ctg cgc gac acc gaa tgg gag gtt cct tac ctg cct atc gat Glu Gln Leu Arg Asp Thr Glu Trp Glu Val Pro Tyr Leu Pro Ile Asp 285	1248
cca aag gat gtc ggt cgc gac tac gag gct gtt atc cgc gtg aac tcc Pro Lys Asp Val Gly Arg Asp Tyr Glu Ala Val Ile Arg Val Asn Ser 290	1296
cag tcc ggc aag ggc ggc gtt gct tac atc atg aag acc gat cac ggt Gln Ser Gly Lys Gly Gly Val Ala 295 Tyr Ile Met Lys Thr 300 His Gly	1344
ctg cag atc cct cgc tcc atg cag gtt gag ttc tcc acc gtt gtc cag	1392

ES 2 666 072 T3

Leu Gln Ile Pro Arg Ser Met Gln Val Glu Phe Ser Thr Val Val Gln
 450 455 460
 aac gtc acc gac gct gag ggc ggc gag gtc aac tcc aag gca atg tgg 1440
 Asn Val Thr Asp Ala Glu Gly Gly Glu Val Asn Ser Lys Ala Met Trp
 465 470 475 480
 gat atc ttc gcc acc gag tac ctg gag cgc acc gca cca gtt gag cag 1488
 Asp Ile Phe Ala Thr Glu Tyr Leu Glu Arg Thr Ala Pro Val Glu Gln
 485 490 495
 atc gcg ctg cgc gtc gag aac gct cag acc gaa aac gag gat gca tcc 1536
 Ile Ala Leu Arg Val Glu Asn Ala Gln Thr Glu Asn Glu Asp Ala Ser
 500 505 510
 atc acc gcc gag ctc atc cac aac ggc aag gac gtc acc gtc gat ggc 1584
 Ile Thr Ala Glu Leu Ile His Asn Gly Lys Asp Val Thr Val Asp Gly
 515 520 525
 cgc ggc aac ggc cca ctg gcc gct tac gcc aac gcg ctg gag aag ctg 1632
 Arg Gly Asn Gly Pro Leu Ala Tyr Ala Asn Ala Leu Glu Lys Leu
 530 535 540
 ggc atc gac gtt gag atc cag gaa tac aac cag cac gcc cgc acc tcg 1680
 Gly Ile Asp Val Glu Ile Gln Glu Tyr Asn Gln His Ala Arg Thr Ser
 545 550 555 560
 ggc gac gat gca gaa gca gcc gcc tac gtg ctg gct gag gtc aac ggc 1728
 Gly Asp Asp Ala Glu Ala Ala Tyr Val Leu Ala Glu Val Asn Gly
 565 570 575
 cgc aag gtc tgg ggc gtc ggc atc gct ggc tcc atc acc tac gct tcg 1776
 Arg Lys Val Trp Gly Val Gly Ile Ala Gly Ser Ile Thr Tyr Ala Ser
 580 585 590
 ctg aag gca gtg acc tcc gcc gta aac cgc gcg ctg gac gtc aac cac 1824
 Leu Lys Ala Val Thr Ser Ala Val Asn Arg Ala Leu Asp Val Asn His
 595 600 605
 gag gca gtc ctg gct ggc ggc gtt taa 1851
 Glu Ala Val Leu Ala Gly Gly Val
 610 615

<210> 2

<211> 616

<212> PRT

5 <213> *corynebacterium glutamicum*

<220>

<221> características diversas

<222> (553)..(553)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido proteinogénico, excepto Tyr

10 <400> 2

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

ES 2 666 072 T3

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

ES 2 666 072 T3

				325					330					335		
Phe	Thr	Asp	Ile 340	Arg	Gln	Ile	Arg	Ser 345	Thr	Val	Glu	Tyr	Cys 350	Asn	Gln	
Leu	Arg	Val 355	Pro	Glu	Arg	His	Pro 360	Tyr	Gly	Gly	Asp	Leu 365	Val	Phe	Thr	
Ala	Phe 370	Ser	Gly	Ser	His	Gln 375	Asp	Ala	Val	Asn	Lys 380	Gly	Leu	Asp	Ala	
Met 385	Ala	Ala	Lys	Val	Gln 390	Pro	Gly	Ala	Ser	Ser 395	Thr	Glu	Val	Ser	Trp 400	
Glu	Gln	Leu	Arg	Asp 405	Thr	Glu	Trp	Glu	Val 410	Pro	Tyr	Leu	Pro	Ile 415	Asp	
Pro	Lys	Asp	Val 420	Gly	Arg	Asp	Tyr	Glu 425	Ala	Val	Ile	Arg	Val 430	Asn	Ser	
Gln	Ser	Gly 435	Lys	Gly	Gly	Val	Ala 440	Tyr	Ile	Met	Lys	Thr 445	Asp	His	Gly	
Leu	Gln 450	Ile	Pro	Arg	Ser	Met 455	Gln	Val	Glu	Phe	Ser 460	Thr	Val	Val	Gln	
Asn 465	Val	Thr	Asp	Ala	Glu 470	Gly	Gly	Glu	Val	Asn 475	Ser	Lys	Ala	Met	Trp 480	
Asp	Ile	Phe	Ala	Thr 485	Glu	Tyr	Leu	Glu	Arg 490	Thr	Ala	Pro	Val	Glu 495	Gln	
Ile	Ala	Leu	Arg 500	Val	Glu	Asn	Ala	Gln 505	Thr	Glu	Asn	Glu	Asp 510	Ala	Ser	
Ile	Thr	Ala 515	Glu	Leu	Ile	His	Asn 520	Gly	Lys	Asp	Val	Thr 525	Val	Asp	Gly	
Arg	Gly 530	Asn	Gly	Pro	Leu	Ala 535	Ala	Tyr	Ala	Asn	Ala 540	Leu	Glu	Lys	Leu	
Gly 545	Ile	Asp	Val	Glu	Ile 550	Gln	Glu	Xaa	Asn	Gln 555	His	Ala	Arg	Thr	Ser 560	
Gly	Asp	Asp	Ala	Glu 565	Ala	Ala	Ala	Tyr	Val 570	Leu	Ala	Glu	Val	Asn 575	Gly	
Arg	Lys	Val	Trp 580	Gly	Val	Gly	Ile	Ala 585	Gly	Ser	Ile	Thr	Tyr 590	Ala	Ser	
Leu	Lys	Ala 595	Val	Thr	Ser	Ala	Val 600	Asn	Arg	Ala	Leu	Asp 605	Val	Asn	His	

Glu Ala Val Leu Ala Gly Gly Val
610 615

<210> 3

<211> 3851

5 <212> ADN

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>

<221> CDS

<222> (1001)..(2851)

10 <223> región que codifica leuA

<400> 3

cctttactca atgctctgat gacaccgatg tgggtgggcag gcatgagtag cgcatgctg	60
gcatatttct tacaacagat agcacttggg ttcggcacc tcttggtagt gcaaccagtg	120
cttgtctgt cgctgatgtt cacgctgccg ctctcagcac gattcaatgg ctaccgacta	180
cgccgaactg aaatcttctg ggctaccctc ctccacgtag ccgtgggcat catgatcggt	240
ttgggacgcc cccttcccg aaaccccccac ccccccactcg atcgatggat tccagtactt	300
ttagtcggcg ttgcagtaat ggggtggaatg tggctgcttg cggaatacgt attaaagaag	360
gacaaagccc tcatccttgg tcttgtgacg ggtgcattgt ttggctacgt agcagtgatg	420
tccaaagccg cggtggatct ttttgtccat caaggcataa cgggactcat cttgaactgg	480
gaaggctacg gcctaactct caccgcatta cttggaacaa tcgtgcagca gtattccttt	540
aacgctggcg aactacaaaa atcgctaccc gccatgacca ttgccgaacc aattgttgcc	600
ttcagtttgg gctacttggg tctgggagaa aaattccaag tcgtggactg ggaatggatc	660
gccatgggca tcgcactact ggtgatgatt gtttccacca ttgactgtc tcgtacaagc	720
acaatgccgg ccggatcgaa aaggtaaaac tccaaagtcc ccccgagac atgacagcac	780
tggaactggg cgctgaaaag cttttttaaa agaaaactcc cccgagttgc taccacacc	840
acaaagtgtg tgtatgcttc accacatgac ttcgcgtgag aatctacttc ttcttcgccg	900
cggcgggtcc cagaggtctt aacacgaccg gcatcccgtc gcggagtttg gtgttgccgg	960
tcgtggaccc acccaaaact ttttaagaag gttgaacaca atg tct cct aac gat	1015
	Met Ser Pro Asn Asp 1 5
gca ttc atc tcc gca cct gcc aag atc gaa acc cca gtt ggg cct cgc	1063
Ala Phe Ile Ser Ala Pro Ala Lys Ile Glu Thr Pro Val Gly Pro Arg	10 15 20
aac gaa ggc cag cca gca tgg aat aag cag cgt ggc tcc tca atg cca	1111
Asn Glu Gly Gln Pro Ala Trp Asn Lys Gln Arg Gly Ser Ser Met Pro	25 30 35
gtt aac cgc tac atg cct ttc gag gtt gag gta gaa gat att tct ctg	1159
Val Asn Arg Tyr Met Pro Phe Glu Val Glu Val Glu Asp Ile Ser Leu	40 45 50
ccg gac cgc act tgg cca gat aaa aaa atc acc gtt gca cct cag tgg	1207
Pro Asp Arg Thr Trp Pro Asp Lys Lys Ile Thr Val Ala Pro Gln Trp	55 60 65

ES 2 666 072 T3

tgt Cys 70	gct Ala	gtt Val	gac Asp	ctg Leu	cgt Arg 75	gac Asp	ggc Gly	aac Asn	cag Gln	gct Ala 80	ctg Leu	att Ile	gat Asp	ccg Pro	atg Met 85	1255
tct Ser	cct Pro	gag Glu	cgt Arg	aag Lys 90	cgc Arg	cgc Arg	atg Met	ttt Phe	gag Glu 95	ctg Leu	ctg Leu	gtt Val	cag Gln	atg Met 100	ggc Gly	1303
ttc Phe	aaa Lys	gaa Glu	atc Ile 105	gag Glu	gtc Val	ggg Gly	ttc Phe	cct Pro 110	tca Ser	gct Ala	tcc Ser	cag Gln	act Thr 115	gat Asp	ttt Phe	1351
gat Asp	ttc Phe	gtt Val 120	cgt Arg	gag Glu	atc Ile	atc Ile	gaa Glu 125	aag Lys	ggc Gly	atg Met	atc Ile	cct Pro 130	gac Asp	gat Asp	gtc Val	1399
acc Thr 135	att Ile	cag Gln	gtt Val	ctg Leu	gtt Val	cag Gln 140	gct Ala	cgt Arg	gag Glu	cac His	ctg Leu 145	att Ile	cgc Arg	cgt Arg	act Thr	1447
ttt Phe 150	gaa Glu	gct Ala	tgc Cys	gaa Glu	ggc Gly 155	gca Ala	aaa Lys	aac Asn	gtt Val	atc Ile 160	gtg Val	cac His	ttc Phe	tac Tyr	aac Asn 165	1495
tcc Ser	acc Thr	tcc Ser	atc Ile	ctg Leu 170	cag Gln	cgc Arg	aac Asn	gtg Val	gtg Val 175	ttc Phe	cgc Arg	atg Met	gac Asp	aag Lys 180	gtg Val	1543
cag Gln	gtg Val	aag Lys	aag Lys 185	ctg Leu	gct Ala	acc Thr	gat Asp	gcc Ala 190	gct Ala	gaa Glu	cta Leu	atc Ile	aag Lys 195	acc Thr	atc Ile	1591
gct Ala	cag Gln	gat Asp 200	tac Tyr	cca Pro	gac Asp	acc Thr	aac Asn 205	tgg Trp	cgc Arg	tgg Trp	cag Gln	tac Tyr 210	tcc Ser	cct Pro	gag Glu	1639
tcc Ser 215	ttc Phe	acc Thr	ggc Gly	act Thr	gag Glu	gtt Val 220	gag Glu	tac Tyr	gcc Ala	aag Lys	gaa Glu 225	gtt Val	gtg Val	gac Asp	gca Ala	1687
gtt Val 230	gtt Val	gag Glu	gtc Val	atg Met	gat Asp 235	cca Pro	act Thr	cct Pro	gag Glu	aac Asn 240	cca Pro	atg Met	atc Ile	atc Ile	aac Asn 245	1735
ctg Leu	cct Pro	tcc Ser	acc Thr	gtt Val 250	gag Glu	atg Met	atc Ile	acc Thr	cct Pro 255	aac Asn	gtt Val	tac Tyr	gca Ala	gac Asp 260	tcc Ser	1783
att Ile	gaa Glu	tgg Trp	atg Met 265	cac His	cgc Arg	aat Asn	cta Leu	aac Asn 270	cgt Arg	cgt Arg	gat Asp	tcc Ser	att Ile 275	atc Ile	ctg Leu	1831
tcc Ser	ctg Leu	cac His 280	ccg Pro	cac His	aat Asn	gac Asp	cgt Arg 285	ggc Gly	acc Thr	ggc Gly	gtt Val	ggc Gly 290	gca Ala	gct Ala	gag Glu	1879
ctg Leu	ggc Gly 295	tac Tyr	atg Met	gct Ala	ggc Gly 300	gct Ala	gac Asp	cgc Arg	atc Ile	gaa Glu	ggc Gly 305	tgc Cys	ctg Leu	ttc Phe	ggc Gly	1927
aac Asn 310	ggc Gly	gag Glu	cgc Arg	acc Thr	ggc Gly 315	aac Asn	gtc Val	tgc Cys	ctg Leu	gtc Val 320	acc Thr	ctg Leu	gca Ala	ctg Leu	aac Asn 325	1975
atg Met	ctg Leu	acc Thr	cag Gln	ggc Gly 330	gtt Val	gac Asp	cct Pro	cag Gln	ctg Leu 335	gac Asp	ttc Phe	acc Thr	gat Asp	ata Ile 340	cgc Arg	2023

ES 2 666 072 T3

cag atc cgc agc acc gtt gaa tac tgc aac cag ctg cgc gtt cct gag Gln Ile Arg Ser Thr Val Glu Tyr Cys Asn Gln Leu Arg Val Pro Glu 345 350 355	2071
cgc cac cca tac ggc ggt gac ctg gtc ttc acc gct ttc tcc ggt tcc Arg His Pro Tyr Gly Gly Asp Leu Val Phe Thr Ala Phe Ser Gly Ser 360 365 370	2119
cac cag gac gct gtg aac aag ggt ctg gac gcc atg gct gcc aag gtt His Gln Asp Ala Val Asn Lys Gly Leu Asp Ala Met Ala Lys Val 375 380 385	2167
cag cca ggt gct agc tcc act gaa gtt tct tgg gag cag ctg cgc gac Gln Pro Gly Ala Ser Ser Thr Glu Val Ser Trp Glu Gln Leu Arg Asp 390 395 400 405	2215
acc gaa tgg gag gtt cct tac ctg cct atc gat cca aag gat gtc ggt Thr Glu Trp Glu Val Pro Tyr Leu Pro Ile Asp Pro Lys Asp Val Gly 410 415 420	2263
cgc gac tac gag gct gtt atc cgc gtg aac tcc cag tcc ggc aag ggc Arg Asp Tyr Glu Ala Val Ile Arg Val Asn Ser Gln Ser Gly Lys Gly 425 430 435	2311
ggc gtt gct tac atc atg aag acc gat cac ggt ctg cag atc cct cgc Gly Val Ala Tyr Ile Met Lys Thr Asp His Gly Leu Gln Ile Pro Arg 440 445 450	2359
tcc atg cag gtt gag ttc tcc acc gtt gtc cag aac gtc acc gac gct Ser Met Gln Val Glu Phe Ser Thr Val Val Gln Val Thr Asp Ala 455 460 465	2407
gag ggc ggc gag gtc aac tcc aag gca atg tgg gat atc ttc gcc acc Glu Gly Gly Glu Val Asn Ser Lys Ala Met Trp Asp Ile Phe Ala Thr 470 475 480 485	2455
gag tac ctg gag cgc acc gca cca gtt gag cag atc gcg ctg cgc gtc Glu Tyr Leu Glu Arg Thr Ala Pro Val Glu Gln Ile Ala Leu Arg Val 490 495 500	2503
gag aac gct cag acc gaa aac gag gat gca tcc atc acc gcc gag ctc Glu Asn Ala Gln Thr Glu Asn Glu Asp Ala Ser Ile Thr Ala Glu Leu 505 510 515	2551
atc cac aac ggc aag gac gtc acc gtc gat ggc cgc ggc aac ggc cca Ile His Asn Gly Lys Asp Val Thr Val Asp Gly Arg Gly Asn Gly Pro 520 525 530	2599
ctg gcc gct tac gcc aac gcg ctg gag aag ctg ggc atc gac gtt gag Leu Ala Ala Tyr Ala Asn Ala Leu Glu Lys Leu Gly Ile Asp Val Glu 535 540 545	2647
atc cag gaa tac aac cag cac gcc cgc acc tcg ggc gac gat gca gaa Ile Gln Glu Tyr Asn Gln His Ala Arg Thr Ser Gly Asp Asp Ala Glu 550 555 560 565	2695
gca gcc gcc tac gtg ctg gct gag gtc aac ggc cgc aag gtc tgg ggc Ala Ala Ala Tyr Val Leu Ala Glu Val Asn Gly Arg Lys Val Trp Gly 570 575 580	2743
gtc ggc atc gct ggc tcc atc acc tac gct tcg ctg aag gca gtg acc Val Gly Ile Ala Gly Ser Ile Thr Tyr Ala Ser Leu Lys Ala Val Thr 585 590 595	2791
tcc gcc gta aac cgc gcg ctg gac gtc aac cac gag gca gtc ctg gct Ser Ala Val Asn Arg Ala Leu Asp Val Asn His Glu Ala Val Leu Ala 600 605 610	2839
ggc ggc gtt taa gctttacgac gcctccccct aggcctctaca aaccggtggc	2891

ES 2 666 072 T3

Gly Gly Val
615

```
aagaattcca cgatgttgaa aattcttgcc accggtttcg tgggtgatag gaatatagag 2951
cctgtttcat gcctcgagtt ttctcaaatg atttttcgta tgcccaaggc cctcaaaacc 3011
cattagaagc acctctgggg gatataacct acccaggcca aagtcgaaat ttgagagcga 3071
ccaaaccatg agacccaaaa acttgaaaaa acatgctttc tggggcctta tgtctggtac 3131
caacgagtcc cggcgctttt caccatttag attgcgcaag ctgggcgtgc aaccatcagt 3191
ttttaaacct ttcttcacca ggtgatcgaa aatgcccggg tatcctatgg atttggtcat 3251
ctacaaccat caacgacat ttgcatgcct tgaaatgctg tgaaacctct ctaagcaact 3311
agagttgtaa aaatgagcac cacttcggaa tcacaagatc acgccgcaag aatcgaagct 3371
gagcgccaag aagctattga ggcggctcct ttgtttccg tcagcattca atcaagtgga 3431
atccacccat cgacttcacg catggtcacc attgatttgg taacgctgtc ccctaatttg 3491
gagccggtgg aaacttttca tgccgtgttg gattccaaaa ctgacacctg ccccttcac 3551
cttcatggcg tgacagagga agaatttgcc agcgctaagc gtttcggcca gattttgaaa 3611
agcttgacc gcctcatcga tggctgtacc ctgttgatcc acaatgctgc gcgaagtgg 3671
ggctttattg ttccgaagc caagcgct atgaatgatg ctgcgcgcgc caatcgcaac 3731
agcaatcgtg gaaatcgccg tgggtgctgc ggacgccgca ggcagcgct ggggcacatc 3791
ccaaagccgc tgggtgatcgt cgatacgctt gcatcgccgc gtcgacaagc aatcgcttta 3851
```

<210> 4

<211> 616

<212> PRT

5 <213> *corynebacterium glutamicum*

<400> 4

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

Pro Val Gly Pro Arg Asn Glu Gly Gln Pro Ala Trp Asn Lys Gln Arg
20           25           30

Gly Ser Ser Met Pro Val Asn Arg Tyr Met Pro Phe Glu Val Glu Val
35           40           45

Glu Asp Ile Ser Leu Pro Asp Arg Thr Trp Pro Asp Lys Lys Ile Thr
50           55           60

Val Ala Pro Gln Trp Cys Ala Val Asp Leu Arg Asp Gly Asn Gln Ala
65           70           75           80

Leu Ile Asp Pro Met Ser Pro Glu Arg Lys Arg Arg Met Phe Glu Leu
85           90           95

Leu Val Gln Met Gly Phe Lys Glu Ile Glu Val Gly Phe Pro Ser Ala
100          105          110
```

ES 2 666 072 T3

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

ES 2 666 072 T3

Met Ala Ala Lys Val Gln Pro Gly Ala Ser Ser Thr Glu Val Ser Trp
385 390 395 400

Glu Gln Leu Arg Asp Thr Glu Trp Glu Val Pro Tyr Leu Pro Ile Asp
405 410 415

Pro Lys Asp Val Gly Arg Asp Tyr Glu Ala Val Ile Arg Val Asn Ser
420 425 430

Gln Ser Gly Lys Gly Gly Val Ala Tyr Ile Met Lys Thr Asp His Gly
435 440 445

Leu Gln Ile Pro Arg Ser Met Gln Val Glu Phe Ser Thr Val Val Gln
450 455 460

Asn Val Thr Asp Ala Glu Gly Gly Glu Val Asn Ser Lys Ala Met Trp
465 470 475 480

Asp Ile Phe Ala Thr Glu Tyr Leu Glu Arg Thr Ala Pro Val Glu Gln
485 490 495

Ile Ala Leu Arg Val Glu Asn Ala Gln Thr Glu Asn Glu Asp Ala Ser
500 505 510

Ile Thr Ala Glu Leu Ile His Asn Gly Lys Asp Val Thr Val Asp Gly
515 520 525

Arg Gly Asn Gly Pro Leu Ala Ala Tyr Ala Asn Ala Leu Glu Lys Leu
530 535 540

Gly Ile Asp Val Glu Ile Gln Glu Tyr Asn Gln His Ala Arg Thr Ser
545 550 555 560

Gly Asp Asp Ala Glu Ala Ala Ala Tyr Val Leu Ala Glu Val Asn Gly
565 570 575

Arg Lys Val Trp Gly Val Gly Ile Ala Gly Ser Ile Thr Tyr Ala Ser
580 585 590

Leu Lys Ala Val Thr Ser Ala Val Asn Arg Ala Leu Asp Val Asn His
595 600 605

Glu Ala Val Leu Ala Gly Gly Val
610 615

<210> 5

<211> 1851

<212> ADN

5 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1851)

<223> región que codifica leuA

<220>

<221> mutación

5 <222> (1657)..(1657)

<223> Intercambio de t por g

<400> 5

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

ES 2 666 072 T3

cca atg atc atc aac ctg cct tcc acc gtt gag atg atc acc cct aac Pro Met Ile Ile Asn 245 Leu Pro Ser Thr Val 250 Glu Met Ile Thr 255 Pro Asn	768
gtt tac gca gac tcc att gaa tgg atg cac cgc aat cta aac cgt cgt Val Tyr Ala Asp Ser Ile Glu Trp Met His Arg Asn Leu Asn Arg Arg 260 265 270	816
gat tcc att atc ctg tcc ctg cac ccg cac aat gac cgt ggc acc ggc Asp Ser Ile Ile Leu Ser Leu His 280 Pro His Asn Asp Arg Gly Thr Gly 275 285	864
gtt ggc gca gct gag ctg ggc tac atg gct ggc gct gac cgc atc gaa Val Gly 290 Ala Ala Glu Leu Gly 295 Tyr Met Ala Gly 300 Ala Asp Arg Ile Glu	912
ggc tgc ctg ttc ggc aac ggc gag cgc acc ggc aac gtc tgc ctg gtc Gly 305 Cys Leu Phe Gly 310 Asn Gly Glu Arg Thr 315 Asn Val Cys Leu Val 320	960
acc ctg gca ctg aac atg ctg acc cag ggc gtt gac cct cag ctg gac Thr Leu Ala Leu Asn 325 Met Leu Thr Gln Gly 330 Val Asp Pro Gln Leu Asp 335	1008
ttc acc gat ata cgc cag atc cgc agc acc gtt gaa tac tgc aac cag Phe Thr Asp Ile Arg Gln Ile Arg Ser 345 Thr Val Glu Tyr Cys 350 Asn Gln	1056
ctg cgc gtt cct gag cgc cac cca tac ggc ggt gac ctg gtc ttc acc Leu Arg Val 355 Pro Glu Arg His Pro 360 Tyr Gly Gly Asp Leu Val Phe Thr 365	1104
gct ttc tcc ggt tcc cac cag gac gct gtg aac aag ggt ctg gac gcc Ala Phe 370 Ser Gly Ser His 375 Asn Asp Ala Val Asn Lys 380 Gly Leu Asp Ala	1152
atg gct gcc aag gtt cag cca ggt gct agc tcc act gaa gtt tct tgg Met 385 Ala Ala Lys Val Gln Pro Gly Ala Ser Ser Thr Glu Val Ser Trp 400	1200
gag cag ctg cgc gac acc gaa tgg gag gtt cct tac ctg cct atc gat Glu Gln Leu Arg 405 Asp Thr Glu Trp Glu Val 410 Pro Tyr Leu Pro Ile Asp 415	1248
cca aag gat gtc ggt cgc gac tac gag gct gtt atc cgc gtg aac tcc Pro Lys Asp Val 420 Gly Arg Asp Tyr Glu Ala Val Ile Arg Val Asn Ser 430	1296
cag tcc ggc aag ggc ggc gtt gct tac atc atg aag acc gat cac ggt Gln Ser Gly 435 Lys Gly Gly Val Ala Tyr Ile Met Lys Thr 445 Asp His Gly	1344
ctg cag atc cct cgc tcc atg cag gtt gag ttc tcc acc gtt gtc cag Leu Gln Ile Pro Arg Ser Met 455 Gln Val Glu Phe Ser Thr Val Val Gln 460	1392
aac gtc acc gac gct gag ggc ggc gag gtc aac tcc aag gca atg tgg Asn Val Thr Asp Ala Glu Gly 470 Gly Glu Val Asn Ser Lys Ala Met Trp 480	1440
gat atc ttc gcc acc gag tac ctg gag cgc acc gca cca gtt gag cag Asp Ile Phe Ala Thr 485 Glu Tyr Leu Glu Arg 490 Thr Ala Pro Val 495 Glu Gln	1488
atc gcg ctg cgc gtc gag aac gct cag acc gaa aac gag gat gca tcc Ile Ala Leu Arg 500 Val Glu Asn Ala Gln 505 Thr Glu Asn Glu Asp 510 Ala Ser	1536
atc acc gcc gag ctc atc cac aac ggc aag gac gtc acc gtc gat ggc	1584

ES 2 666 072 T3

Ile Thr Ala Glu Leu Ile His Asn Gly Lys Asp Val Thr Val Asp Gly
515 520 525

cgc ggc aac ggc cca ctg gcc gct tac gcc aac gcg ctg gag aag ctg 1632
Arg Gly Asn Gly Pro Leu Ala Ala Tyr Ala Asn Ala Leu Glu Lys Leu
530 535 540

ggc atc gac gtt gag atc cag gaa gac aac cag cac gcc cgc acc tcg 1680
Gly Ile Asp Val Glu Ile Gln Glu Asp Asn Gln His Ala Arg Thr Ser
545 550 555 560

ggc gac gat gca gaa gca gcc gcc tac gtg ctg gct gag gtc aac ggc 1728
Gly Asp Asp Ala Glu Ala Ala Tyr Val Leu Ala Glu Val Asn Gly
565 570 575

cgc aag gtc tgg ggc gtc ggc atc gct ggc tcc atc acc tac gct tcg 1776
Arg Lys Val Trp Gly Val Gly Ile Ala Gly Ser Ile Thr Tyr Ala Ser
580 585 590

ctg aag gca gtg acc tcc gcc gta aac cgc gcg ctg gac gtc aac cac 1824
Leu Lys Ala Val Thr Ser Ala Val Asn Arg Ala Leu Asp Val Asn His
595 600 605

gag gca gtc ctg gct ggc ggc gtt taa 1851
Glu Ala Val Leu Ala Gly Gly Val
610 615

<210> 6

<211> 616

<212> PRT

5 <213> *corynebacterium glutamicum*

<400> 6

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

Pro Val Gly Pro Arg Asn Glu Gly Gln Pro Ala Trp Asn Lys Gln Arg
20 25 30

Gly Ser Ser Met Pro Val Asn Arg Tyr Met Pro Phe Glu Val Glu Val
35 40 45

Glu Asp Ile Ser Leu Pro Asp Arg Thr Trp Pro Asp Lys Lys Ile Thr
50 55 60

Val Ala Pro Gln Trp Cys Ala Val Asp Leu Arg Asp Gly Asn Gln Ala
65 70 75 80

Leu Ile Asp Pro Met Ser Pro Glu Arg Lys Arg Arg Met Phe Glu Leu
85 90 95

Leu Val Gln Met Gly Phe Lys Glu Ile Glu Val Gly Phe Pro Ser Ala
100 105 110

Ser Gln Thr Asp Phe Asp Phe Val Arg Glu Ile Ile Glu Lys Gly Met
115 120 125

Ile Pro Asp Asp Val Thr Ile Gln Val Leu Val Gln Ala Arg Glu His
130 135 140

ES 2 666 072 T3

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

ES 2 666 072 T3

Pro Lys Asp Val Gly Arg Asp Tyr Glu Ala Val Ile Arg Val Asn Ser
420 425 430

Gln Ser Gly Lys Gly Gly Val Ala Tyr Ile Met Lys Thr Asp His Gly
435 440 445

Leu Gln Ile Pro Arg Ser Met Gln Val Glu Phe Ser Thr Val Val Gln
450 455 460

Asn Val Thr Asp Ala Glu Gly Gly Glu Val Asn Ser Lys Ala Met Trp
465 470 475 480

Asp Ile Phe Ala Thr Glu Tyr Leu Glu Arg Thr Ala Pro Val Glu Gln
485 490 495

Ile Ala Leu Arg Val Glu Asn Ala Gln Thr Glu Asn Glu Asp Ala Ser
500 505 510

Ile Thr Ala Glu Leu Ile His Asn Gly Lys Asp Val Thr Val Asp Gly
515 520 525

Arg Gly Asn Gly Pro Leu Ala Ala Tyr Ala Asn Ala Leu Glu Lys Leu
530 535 540

Gly Ile Asp Val Glu Ile Gln Glu Asp Asn Gln His Ala Arg Thr Ser
545 550 555 560

Gly Asp Asp Ala Glu Ala Ala Ala Tyr Val Leu Ala Glu Val Asn Gly
565 570 575

Arg Lys Val Trp Gly Val Gly Ile Ala Gly Ser Ile Thr Tyr Ala Ser
580 585 590

Leu Lys Ala Val Thr Ser Ala Val Asn Arg Ala Leu Asp Val Asn His
595 600 605

Glu Ala Val Leu Ala Gly Gly Val
610 615

<210> 7

<211> 812

5 <212> ADN

<213> *corynebacterium glutamicum*

<220>

<221> características diversas

<222> (1)..(6)

10 <223> sitio de corte de SphI

<220>

<221> gen

<222> (7)..(600)

<223> término C del gen leuA

<220>

<221> mutación

<222> (406)..(406)

<223> Intercambio de t por g

5 <220>

<221> características diversas

<222> (807)..(812)

<223> sitio de corte de BamH

<400> 7

gcatgcgtcg gtcgcgacta cgaggctggt atccgcgtga actcccagtc cggcaagggc	60
ggcgttgctt acatcatgaa gaccgatcac ggtctgcaga tccctcgctc catgcagggtt	120
gagttctcca ccgttggtcca gaacgtcacc gacgctgagg gcggcgaggt caactccaag	180
gcaatgtggg atatcttcgc caccgagtac ctggagcgca ccgcaccagt tgagcagatc	240
gcgctgcgcg tcgagaacgc tcagaccgaa aacgaggatg catccatcac cgccgagctc	300
atccacaacg gcaaggacgt caccgtcgat ggccgcggca acggccact ggccgcttac	360
gccaacgcgc tggagaagct gggcatcgac gttgagatcc aggaagacaa ccagcacgcc	420
cgcacctcgg gcgacgatgc agaagcagcc gcctacgtgc tggctgaggt caacggccgc	480
aaggctctgg gcgtcggcat cgctggctcc atcacctacg cttcgtgaa ggcagtgacc	540
tccgccgtaa accgcgcgct ggacgtcaac cagcaggcag tcctggctgg cggcgtttaa	600
gctttacgac gcctccccct aggtcttaca aaccggtggc aagaattcca cgatgttgaa	660
aattcttgcc accggtttcg tgggtgatag gaatatagag cctgtttcat gcctcgagtt	720
ttctcaaatg atttttcgta tgcccaaggc cctcaaaacc cattagaagc acctctgggg	780
gatataacct acccaggcca aagtcgggat cc	812

<210> 8

<211> 30

<212> ADN

<213> *corynebacterium glutamicum*

15 <220>

<221> característica diversa

<222> (1)..(30)

<223> Cebador ilvE-XbaI-fw

<400> 8

20 gctctagagc caagcctagc cattcctcaa 30

<210> 9

<211> 30

<212> ADN

<213> *corynebacterium glutamicum*

25 <220>

<221> característica diversa
 <222> (1)..(30)
 <223> Cebador ilvE-XbaI-rev
 <400> 9
 5 gctctagagc cagccactgc attctccta 30
 <210> 10
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium glutamicum*
 10 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (1)..(32)
 <223> Cebador leuA1
 <400> 10
 15 gatctatcta gattgagggc cttgggcata cg 32
 <210> 11
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium glutamicum*
 20 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (1)..(32)
 <223> Cebador leuA-2
 <400> 11
 25 gatctaggat ccgcgactac gaggctgta tc 32
 <210> 12
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium glutamicum*
 30 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (1)..(32)
 <223> Cebador leuA-3
 <400> 12
 35 gatctatcta gaaagcttaa acgcccag cc 32
 <210> 13
 <211> 6504

- <212> ADN
- <213> *Corynebacterium glutamicum*
- <220>
- <221> gen
- 5 <222> (365)..(1159)
- <223> gen de resistencia a kanamicina
- <220>
- <221> gen
- <222> (1651)..(3072)
- 10 <223> gen sacB que codifica la proteína levano sacarasa
- <220>
- <221> característica diversa
- <222> (3473)..(3571)
- <223> sitio de movilización RP4
- 15 <220>
- <221> origen de replicación
- <222> (5091)..(5093)
- <223> origen similar a ColE1 de pMB1
- <220>
- 20 <221> características diversas
- <222> (5531)..(6330)
- <223> fragmento de tipo gen
- <220>
- <221> características diversas
- 25 <222> (5737)..(6330)
- <223> término C del gen leuA (594 pb)
- <220>
- <221> mutación
- <222> (5929)..(5931)
- 30 <223> T a G, cambia el codón de tipo salvaje TAC (que codifica el aminoácido Y, tirosina) al codón GAC (que codifica el aminoácido D, aspartato) (Y553D)
- <400> 13

ES 2 666 072 T3

cgataagcta	gcttcacgct	gccgcaagca	ctcagggcgc	aagggctgct	aaaggaagcg	60
gaacacgtag	aaagccagtc	cgcagaaacg	gtgctgaccc	cggatgaatg	tcagctactg	120
ggctatctgg	acaagggaaa	acgcaagcgc	aaagagaaa	caggtagctt	gcagtgggct	180
tacatggcga	tagctagact	gggcggtttt	atggacagca	agcgaaccgg	aattgccagc	240
tggggcgccc	tctggtaagg	ttgggaagcc	ctgcaaagta	aactggatgg	ctttcttgcc	300
gccaaggatc	tgatggcgca	ggggatcaag	atctgatcaa	gagacaggat	gaggatcggt	360
tcgcatgatt	gaacaagatg	gattgcacgc	aggttctccg	gccgcttggg	tggagaggct	420
attcggctat	gactgggcac	aacagacaat	cggctgctct	gatgccgccg	tgttccggct	480
gtcagcgag	gggcgcccgg	ttctttttgt	caagaccgac	ctgtccggtg	ccctgaatga	540
actccaagac	gaggcagcgc	ggctatcgtg	gctggccacg	acgggcgttc	cttgccgagc	600
tgtgctcgac	gttgtcactg	aagcgggaag	ggactggctg	ctattgggcg	aagtgccggg	660
gcaggatctc	ctgtcatctc	accttgctcc	tgccgagaaa	gtatccatca	tggctgatgc	720
aatgcggcgg	ctgcatacgc	ttgatccggc	tacctgccca	ttcgaccacc	aagcgaaaca	780
tcgcatcgag	cgagcacgta	ctcggatgga	agccggctct	gtcgatcagg	atgatctgga	840
cgaagagcat	caggggctcg	cgccagccga	actgttcgcc	aggctcaagg	cgcggatgcc	900
cgacggcgag	gatctcgtcg	tgacccatgg	cgatgcctgc	ttgccgaata	tcatggtgga	960
aaatggccgc	ttttctggat	tcatcgactg	tggccggctg	ggtgtggcgg	accgctatca	1020
ggacatagcg	ttggctaccc	gtgatattgc	tgaagagctt	ggcggcgaat	gggctgaccg	1080
cttcctcgtg	ctttacggta	tcgccgctcc	cgattcgag	cgcacgcct	tctatcgctt	1140
tcttgacgag	ttcttctgag	cgggactctg	gggttcgcta	gaggatcgat	cctttttaac	1200
ccatcacata	tacctgccgt	tcactattat	ttagtgaaat	gagatattat	gatattttct	1260
gaattgtgat	taaaaaggca	actttatgcc	catgcaacag	aaactataaa	aaatacagag	1320
aatgaaaaga	aacagataga	tttttttagtt	ctttaggccc	gtagtctgca	aatcctttta	1380
tgattttcta	tcaaacaaaa	gaggaaaata	gaccagttgc	aatccaaacg	agagtctaata	1440
agaatgaggt	cgaaaagtaa	atcgcgcggg	tttgttactg	ataaagcagg	caagacctaa	1500

ES 2 666 072 T3

aatgtgtaaa	gggcaaagt	tatactttgg	cgtaaccct	tacatatttt	aggtcttttt	1560
ttattgtg	taactaact	gccatcttca	aacaggaggg	ctggaagaag	cagaccgcta	1620
acacagtaca	taaaaaagga	gacatgaacg	atgaacatca	aaaagtttgc	aaaacaagca	1680
acagtattaa	cctttactac	cgactgctg	gcaggaggcg	caactcaagc	gtttgcgaaa	1740
gaaacgaacc	aaaagccata	taaggaaaca	tacggcattt	cccatattac	acgccatgat	1800
atgctgcaaa	tccctgaaca	gcaaaaaaat	gaaaaatatc	aagtttctga	atttgattcg	1860
tccacaatta	aaaatatctc	ttctgcaaaa	ggcctggacg	tttgggacag	ctggccatta	1920
caaaacgctg	acggcactgt	cgcaaaactat	cacggctacc	acatcgtctt	tgcattagcc	1980
ggagatccta	aaaatgcgga	tgacacatcg	atttacctgt	tctatcaaaa	agtcggcgaa	2040
acttctattg	acagctggaa	aaacgctggc	cgcgtcttta	aagacagcga	caaattcgat	2100
gcaaattgatt	ctatcctaaa	agaccaaaaca	caagaatggg	caggttcagc	cacatttaca	2160
tctgacggaa	aatccgttt	attctacact	gatttctccg	gtaaacatta	cggcaaaaca	2220
acactgacaa	ctgcacaagt	taacgtatca	gcatcagaca	gctctttgaa	catcaacggg	2280
gtagaggatt	ataaatcaat	ctttgacggg	gacggaaaaa	cgtatcaaaa	tgtacagcag	2340
ttcatcgatg	aaggcaacta	cagctcaggc	gacaaccata	cgtgagaga	tcctcactac	2400
gtagaagata	aaggccacaa	atacttagta	tttgaagcaa	acactggaac	tgaagatggc	2460
taccaaggcg	aagaatcttt	atttaacaaa	gcatactatg	gcaaaagcac	atcattcttc	2520
cgtcaagaaa	gtcaaaaact	tctgcaaagc	gataaaaaac	gcacggctga	gttagcaaac	2580
ggcgtctctg	gtatgattga	gctaaacgat	gattacacac	tgaaaaaagt	gatgaaaccg	2640
ctgattgcat	ctaacacagt	aacagatgaa	attgaacgcg	cgaacgtctt	taaaatgaac	2700
ggcaaatggg	acctgttcac	tgactcccg	ggatcaaaaa	tgacgattga	cggcattacg	2760
tctaacgata	tttacctgct	tggttatggt	tctaattctt	taactggccc	atacaagccg	2820
ctgaacaaaa	ctggccttgt	gttaaaaaatg	gatcttgatc	ctaacgatgt	aacctttact	2880
tactcacact	tcgctgtacc	tcaagcgaaa	ggaacaatg	tcgtgattac	aagctatatg	2940
acaaacagag	gattctacgc	agacaaacaa	tcaacgtttg	cgccgagctt	cctgctgaac	3000
atcaaaggca	agaaaacatc	tgttgtcaaa	gacagcatcc	ttgaacaagg	acaattaaca	3060
gttaacaaat	aaaaacgcaa	aagaaaatgc	cgatgggtac	cgagcgaaat	gaccgaccaa	3120
gcgacgcccc	acctgccatc	acgagatttc	gattccaccg	ccgccttcta	tgaaagggtg	3180
ggcttcggaa	tcgttttccg	ggacgccctc	gcggacgtgc	tcatagtcca	cgacgcccg	3240
gattttgtag	ccctggccga	cggccagcag	gtaggccgac	aggctcatgc	cggccgccgc	3300
cgccttttcc	tcaatcgctc	ttcgttcgtc	tggaaggcag	tacacctga	taggtgggct	3360
gcccttcctg	gttggttgg	tttcatcagc	catccgcttg	ccctcatctg	ttacgccggc	3420
ggtagccggc	cagcctcgca	gagcaggatt	cccgttgagc	accgccaggt	gcgaataagg	3480
gacagtgaag	aaggaacacc	cgctcgcggg	tgggcctact	tcacctatcc	tgccccgctg	3540

ES 2 666 072 T3

acgccgttgg	atacaccaag	gaaagtctac	acgaaccctt	tggcaaaatc	ctgtatatcg	3600
tgcgaaaaag	gatggatata	ccgaaaaaat	cgctataatg	accccgaagc	agggttatgc	3660
agcggaaaag	cgctgcttcc	ctgctgtttt	gtggaatata	taccgactgg	aaacaggcaa	3720
atgcaggaaa	ttactgaact	gaggggacag	gcgagagacg	atgccaaaga	gctcctgaaa	3780
atctcgataa	ctcaaaaaat	acgcccggta	gtgatcttat	ttcattatgg	tgaaagttag	3840
aacctcttac	gtgccgatca	acgtctcatt	ttcgccaaaa	gttggcccag	ggcttcccgg	3900
tatcaacagg	gacaccagga	tttattttatt	ctgcgaagtg	atcttccgtc	acaggatttt	3960
attcggcgca	aagtgcgtcg	ggtgatgctg	ccaacttact	gatttagtgt	atgatggtgt	4020
ttttgaggtg	ctccagtggc	ttctgtttct	atcagctcct	gaaaatctcg	ataactcaaa	4080
aaatacgccc	ggtagtgatc	ttatttctatt	atggtgaaag	ttggaacctc	ttacgtgccg	4140
atcaacgtct	cattttcgcc	aaaagttggc	ccagggcctc	ccggtatcaa	cagggaacac	4200
aggattttatt	tattctgcga	agtgatcttc	cgtcacaggt	atttattcgg	cgcaagtgc	4260
gtcgggtgat	gctgccaact	tactgattta	gtgtatgatg	gtgtttttga	ggtgctccag	4320
tggcttctgt	ttctatcagg	gctggatgat	cctccagcgc	ggggatctca	tgctggagtt	4380
cttcgcccac	cccaaaagga	tctaggtgaa	gatccttttt	gataatctca	tgacccaaat	4440
cccttaacgt	gagttttcgt	tccactgagc	gtcagacccc	gtagaaaaga	tcaaaggatc	4500
ttcttgagat	cctttttttc	tgcgcgtaat	ctgctgcttg	caaacaaaaa	aaccaccgct	4560
accagcgggtg	gtttgtttgc	cggatcaaga	gctaccaact	ctttttccga	aggtaactgg	4620
cttcagcaga	gcgcagatac	caaatactgt	ccttctagt	tagccgtagt	taggccacca	4680
cttcaagaac	tctgtagcac	cgctacata	cctcgctctg	ctaatacctgt	taccagtggc	4740
tgctgccagt	ggcgataagt	cggtgtctac	cgggttggac	tcaagacgat	agttaccgga	4800
taaggcgagc	cggtcgggct	gaacgggggg	ttcgtgcaca	cagcccagct	tgagcgaac	4860
gacctacacc	gaactgagat	acctacagcg	tgagcattga	gaaagcgcca	cgcttcccga	4920
agggagaaaag	gcggacaggt	atccggtaag	cggcagggtc	ggaacaggag	agcgcacgag	4980
ggagcttcca	gggggaaacg	cctgggtatct	ttatagtcct	gtcgggtttc	gccacctctg	5040
acttgagcgt	cgatttttgt	gatgctcgtc	aggggggctg	agcctatgga	aaaacgccag	5100
caacgcggcc	tttttacggg	tcctggcctt	ttgctggcct	tttgctcaca	tgcttcttcc	5160
tgcgttatcc	cctgattctg	tggaataaccg	tattaccgcc	tttgagttag	ctgataccgc	5220
tcgccgcagc	cgaacgaccg	agcgcagcga	gtcagtgagc	gaggaagcgg	aagagcgccc	5280
aatacgcaaa	ccgcctctcc	ccgcgcgttg	gccgattcat	taatgcagct	ggcacgacag	5340
gtttcccgcg	tggaagcggg	gcagtgagcg	caacgcaatt	aatgtgagtt	agctcactca	5400
ttaggcacc	caggctttac	actttatgct	tccggctcgt	atgttggtg	gaattgtgag	5460
cggataacaa	tttcacacag	gaaacagcta	tgaccatgat	tacgaattcg	agctcgggtac	5520
ccggggatcc	cgactttggc	ctgggtaggt	tatatccccc	agagggtgctt	ctaattgggtt	5580
ttgagggcct	tgggcatacg	aaaaatcatt	tgagaaaact	cgaggcatga	aacaggctct	5640

ES 2 666 072 T3

atattcctat caccacgaa accggtggca agaattttca acatcgtgga attcttgcca	5700
ccggtttgta gagcctaggg ggaggcgtcg taaagcttaa acgccgccag ccaggactgc	5760
ctcgtggttg acgtccagcg cgcggtttac ggcggaggtc actgccttca gcgaagcgta	5820
ggtgatggag ccagcgatgc cgacgcccca gaccttgcgg ccggtgacct cagccagcac	5880
gtaggcggct gcttctgcat cgtcgcccga ggtgcgggcg tgctggttgt cttcctggat	5940
ctcaacgtcg atgcccagct tctccagcgc gttggcgtaa gcggccagtg ggccgttgcc	6000
gcggccatcg acggtgacgt ccttgccggt gtggatgagc tcggcggtga tggatgcatc	6060
ctcgttttcg gtctgagcgt tctcgacgcg cagcgcgatac tgctcaactg gtgcggtgcg	6120
ctccaggtagc tcggtggcga agatatccca cattgccttg gagttgacct cgccgccctc	6180
agcgtcggtg acgttctgga caacggtgga gaactcaacc tgcattggagc gagggatctg	6240
cagaccgtga tcggtcttca tgatgtaagc aacgccgccc ttgccggact gggagttcac	6300
gcggataaca gcctcgtagt cgcgaccgac gcatgcaagc ttggcactgg ccgtcgtttt	6360
acaacgtcgt gactgggaaa accctggcgt tacccaactt aatcgccctg cagcacatcc	6420
ccctttcgcc agctggcgta atagcgaaga ggcccgacc gatcgccctt cccaacagtt	6480
gcgcagcctg aatggcgaat ggcg	6504
201100362 Ausland	

REIVINDICACIONES

1. Secuencia nucleotídica aislada que codifica una secuencia de aminoácidos que es al menos $\geq 90\%$, $\geq 92\%$, $\geq 94\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$, $\geq 99\%$ o 100% , preferiblemente $\geq 97\%$, particularmente de forma preferible $\geq 98\%$, muy particularmente de forma preferible $\geq 99\%$, y extremadamente de forma preferible 100% , idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, en la que SEQ ID NO:2, en la posición 553, o en una posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos, tiene un aminoácido proteinogénico distinto de L-tirosina, y en la que la secuencia nucleotídica es una secuencia nucleotídica replicable que codifica la enzima isopropilmalato sintasa aislada de microorganismos del género *Corynebacterium*, en la que las secuencias proteicas codificadas de ese modo contienen un aminoácido proteinogénico distinto de L-tirosina en la posición correspondiente a la posición 553 de SEQ ID NO:2.
2. Secuencia nucleotídica aislada que codifica una secuencia de aminoácidos que es al menos $\geq 90\%$, $\geq 92\%$, $\geq 94\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$, $\geq 99\%$ o 100% , preferiblemente $\geq 97\%$, particularmente de forma preferible $\geq 98\%$, muy particularmente de forma preferible $\geq 99\%$, y extremadamente de forma preferible 100% , idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, en la que SEQ ID NO:2, en la posición 553, o en una posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos, tiene un aminoácido proteinogénico distinto de L-tirosina, y en la que la secuencia de aminoácidos codificada por dicha secuencia nucleotídica tiene, en la posición 553 o en una posición correspondiente, un aminoácido que se selecciona del grupo que consiste en ácido glutámico, ácido aspártico, alanina, cisteína, serina, treonina, lisina, arginina, glutamina y asparagina, particularmente de forma preferible del grupo que consiste en ácido glutámico y ácido aspártico.
3. Secuencia nucleotídica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que la secuencia de aminoácidos codificada de ese modo tiene, en la posición 553 o en una posición correspondiente, ácido L-aspártico.
4. Secuencia nucleotídica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que tiene guanina en la posición 1657 de SEQ ID NO: 5, o una posición correspondiente de SEQ ID NO: 5.
5. Secuencia nucleotídica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, como se representa en SEQ ID NO: 5.
6. Vector que comprende la secuencia nucleotídica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Vector que comprende la secuencia nucleotídica según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, que es adecuado para la replicación en microorganismos del género *Corynebacterium*.
8. Un polipéptido de isopropilmalato sintasa que tiene inhibición de retroacción reducida con respecto a la enzima de tipo salvaje, que es codificado por la secuencia nucleotídica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
9. Microorganismo del género *Corynebacterium* que comprende la secuencia nucleotídica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o el polipéptido según la reivindicación 8, o el vector según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7.
10. Microorganismo según la reivindicación 9, en el que la secuencia nucleotídica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 está presente en forma sobreexpresada.
11. Microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, caracterizado por que la secuencia nucleotídica está integrada en un cromosoma.
12. Microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizado por que es *Corynebacterium glutamicum*.
13. Microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, caracterizado por que el microorganismo tiene la capacidad de producir una sustancia química fina.
14. Microorganismo según la reivindicación 13, caracterizado por que la sustancia química fina es L-leucina o KIC.
15. Procedimiento fermentativo para producir KIC o L-leucina, que comprende las siguientes etapas:
 - a) fermentar uno de los microorganismos según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 en un medio,
 - b) acumular el KIC o L-leucina en el medio, en el que se obtiene un caldo de fermentación.
16. Procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado por que es un procedimiento que se selecciona del grupo que consiste en procedimiento por lotes, procedimiento por lote alimentado, procedimiento por lote alimentado repetitivo, y procedimiento continuo.
17. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16, caracterizado por que la sustancia química fina o un producto líquido o sólido que contiene la sustancia química fina se obtiene a partir del caldo de fermentación que contiene la sustancia química fina.

18. Uso del microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, para la producción fermentativa de L-leucina o KIC.

Figura 1: Mapa del plásmido pK18mobsacB_leuA_Y553D

